



Universidade Federal da Bahia

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos

MESTRADO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
VERMELHA, VERDE E MARROM EM *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

LAERTE MARLON CONCEIÇÃO DOS SANTOS

SALVADOR – BAHIA

AGOSTO DE 2017

LAERTE MARLON CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
VERMELHA, VERDE E MARROM EM *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal dos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Co-orientador: Profa. Dra. Bruna Aparecida Souza Machado

SALVADOR – BAHIA

AGOSTO DE 2017

“E apliquei o meu coração a esquadrinhar, e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; esta enfadonha ocupação deu Deus aos filhos dos homens, para nela os exercitar. ”

Eclesiastes 1:13

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me concedido o dom da vida durante esta longa caminhada.

Aos meus pais, por toda dedicação, carinho e incentivo e por não medirem esforços para que eu pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.

Ao meu orientador, Ricardo Portela, pelo convívio, paciência, compreensão e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Aos meus amigos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, injeções de ânimo e orações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Portela, por seus ensinamentos que foram tão importantes na minha vida acadêmica e pessoal, e no desenvolvimento da dissertação.

À Prof^a Bruna Machado e ao SENAI CIMATEC pelo interesse e colaboração para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos, colegas e funcionários do LABIMUNO pelos excelentes momentos que compartilhei ao longo desses dois anos.

À Prof^a Lilia de Moura Costa, pelo suporte através do Laboratório de Microbiologia.

À Fúlvia Soares que me ajudou a realizar os experimentos. Muito obrigado por todo apoio!

À Ceíça Aquino pelo suporte dado para a realização deste projeto. Sua ajuda foi fundamental!

Ao Laboratório de Bacterioses do Hospital Veterinário da UFBA, pela contribuição da pesquisa.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal dos Trópicos e a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Meu muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho!

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da estrutura de envelope celular das corinebactérias.....	17
Figura 2. (1) Lesão de LC no linfonodo parotídeo de um ovino adulto; (2) lesão de LC no parênquima pulmonar de ovino	22
Figura 3. Avaliação da atividade antimicrobiana de própolis vermelha brasileira em diferentes condições de pressão e temperatura durante extração supercrítica, sobre a cepa 1002 de <i>C. pseudotuberculosis</i> . As condições foram (A) 50°C e 400 bar; (B) 40°C e 300 bar; (C) 40°C e 400 bar; (D) 50°C e 200 bar	41
Figura 4. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de extrato supercrítico de própolis vermelha sobre <i>C. pseudotuberculosis</i> . As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57(B) e N1(C)	43
Figura 5. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de extrato etanólico de própolis vermelha sobre <i>C. pseudotuberculosis</i> . As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1(C)	44
Figura 6. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de extrato etanólico de própolis verde sobre <i>C. pseudotuberculosis</i> . As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1(C)	45
Figura 7. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de extrato etanólico de própolis marrom sobre <i>C. pseudotuberculosis</i> . As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1(C)	46
Figura 8. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e supercrítico de própolis vermelha, verde e marrom sobre <i>C. pseudotuberculosis</i> , cepa 1002 (A), N1 (B) e VD57(C)	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil.	32
Tabela 2. Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil	33
Tabela 3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG / g), flavonóides (mg EQ / g), atividade antioxidante por DPPH (IC50) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (S CO ₂)	33
Tabela 4. Condições e identificação dos extratos etanólicos e supercríticos de própolis brasileira	35
Tabela 5. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de diferentes cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> pelo método de difusão em disco	39
Tabela 6. Resumo das MICs e MBCs de seis agentes antimicrobianos para os isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> pelo método de microdiluição em caldo.....	40
Tabela 7. MICs e MBCs de extrato supercrítico de própolis vermelha e extratos etanólicos de própolis vermelha, verde e marrom frente aos isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> pelo método de microdiluição em caldo.....	42

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
APDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
BHI	Brain-Heart Infusion
BSC	Própolis marrom do estado de Santa Catarina
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CO₂	Dióxido de carbono
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EtOH	Extração etanólica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
GC/MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
GPR	Própolis verde do estado do Paraná
LC	Linfadenite caseosa
µL	Microlitros
mL	Mililitros
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
nm	Nanômetros
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RAL	Própolis vermelha do estado de Alagoas
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa
RP-HPTLC	Cromatografia de camada fina de alto desempenho de fase reversa
SCO₂	Dióxido de carbono supercrítico
SFE	Extração por fluidos supercríticos
UFC	Unidade de formação de colônias
UV-VIS	Espectroscopia UV/visível

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	14
Objetivo Geral	14
Objetivos específicos.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	15
2. Parede Celular	17
3. Linfadenite Caseosa	18
4. Epidemiologia	19
5. Patogenia e Diagnóstico.....	21
6. Tratamento	24
7. Prevenção e Controle	25
8. Própolis	26
MATERIAL E MÉTODOS	32
1. Obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis.....	32
2. Extração etanólica convencional.....	33
3. Metodologia de extração com fluido supercrítico (CO ₂) utilizando etanol como co-solvente.....	34
4. Cepas Bacterianas	35
5. Ensaio de determinação da sensibilidade de isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> frente a antibióticos comerciais.....	36
6. Ensaio de determinação da sensibilidade de cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> frente aos extratos de própolis vermelha, verde e marrom.....	37
7. Análises estatísticas.....	38
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57

**Atividade antimicrobiana de extratos de própolis vermelha, verde e marrom sobre
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

RESUMO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa debilitante causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. É caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos e órgãos, levando a perdas econômicas significativas na caprinovinocultura. O tratamento clínico da LC é geralmente refratário à terapia antibiótica devido ao encapsulamento dos granulomas. A própolis tem sido objeto de estudos intensivos devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antibacterianas e antifúngicas. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* perante extratos de própolis obtidos pelos métodos de extração supercrítica e etanólica. Foram utilizadas três cepas de *C. pseudotuberculosis*, a cepa padrão 1002, a cepa patogênica VD57 e a cepa viscerotrófica N1. Para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos comerciais utilizaram-se as metodologias de disco difusão e microdiluição em caldo. A metodologia da microdiluição em caldo foi utilizada para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) sobre *C. pseudotuberculosis* frente aos extratos supercríticos e etanólicos de própolis. Os resultados do teste de sensibilidade utilizando antibióticos comerciais indicaram uma elevada sensibilidade das cepas de *C. pseudotuberculosis* aos agentes antimicrobianos. O extrato etanólico de própolis verde apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra *C. pseudotuberculosis*, cepa 1002. O extrato supercrítico de própolis vermelha apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra *C. pseudotuberculosis*, cepa VD57. Foi identificada uma menor atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis marrom frente às cepas testadas. Conclui-se que o extrato de própolis vermelha supercrítica e verde etanólica apresentaram as melhores atividades antimicrobianas contra as cepas de *C. pseudotuberculosis*, e podem ser consideradas como opção em futuros estudos sobre o tratamento e prevenção da LC.

Palavras-chave: extração supercrítica; produtos naturais; linfadenite caseosa; antimicrobianos

ABSTRACT

Antimicrobial activity of red, green and brown extracts on *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Caseous lymphadenitis (CLA) is an infectious-contagious debilitating disease caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*. It is characterized by the development of encapsulated granulomes in lymph nodes and organs, and causes significant economic losses in goats and sheep breeding. The clinical treatment of CLA is normally inefficient, since the antibiotics are not able to penetrate the granulome's capsules. Propolis have been extensively studied due to its biological and pharmacological properties, especially the antibiotic potential. The present study had the objective to evaluate the susceptibility of *C. pseudotuberculosis* strains to ethanolic and supercritical extracts of propolis. Three bacterial strains were used, the standard 1002 strain, the viscerotropic N1 strain and the virulent VD57 strain. For the susceptibility to commercially available antibiotics evaluation, the disc diffusion and the broth microdilution methodologies were used. The methodology of broth microdilution was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericide Concentration (MBC) of the propolis extracts on the *C. pseudotuberculosis* strains. The results of the assays using commercial antibiotics showed a high susceptibility for several compounds. The red propolis supercritical extract presented the best activity on the VD57 strain, while the green ethanolic extract had the best action on the 1002 strain. The brown propolis ethanolic extract showed to be the less effective extract. It can be concluded that the red propolis supercritical extract and the green propolis ethanolic extract have the best antimicrobial activity on *C. pseudotuberculosis* and can be considered as potential compounds in future in vivo studies on the treatment and prevention of CLA.

Keywords: antimicrobial compounds; caseous lymphadenitis, natural products; supercritical extraction

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho de cerca de 28 milhões de pequenos ruminantes, sendo 34,3% de caprinos e 65,7% de ovinos. Dos caprinos, 1,4% encontra-se na Região Norte, 93% no Nordeste, 2,4% no Sudeste, 1,9% no Sul e 1% no Centro-Oeste. Com relação ao rebanho ovino, 3,6% encontra-se na Região Norte, 60,6% no Nordeste, 3,8% no Sudeste, 26,5% no Sul e 5,6% no Centro-Oeste (IBGE, 2015). Os pequenos ruminantes constituem a principal fonte de proteína e de renda para a população rural da Bahia, visto a adaptabilidade destas espécies às características biogeográficas do estado. No entanto, muitas enfermidades vêm induzindo perdas econômicas significativas nestas atividades pecuárias (CAMPOS *et al.*, 2016; HASEGAWA *et al.*, 2017).

Dentre estas enfermidades destaca-se a Linfadenite Caseosa (LC), conhecida popularmente como “mal do caroço”, “caroço”, ou “falsa tuberculose”, definida como uma doença infectocontagiosa, crônica, debilitante (DORELLA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007). Seu agente etiológico, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma bactéria gram-positiva e intracelular facultativa, que exhibe formas pleomórficas, que variam desde cocóides a bastões filamentosos (DORELLA *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2016). Por se tratar de uma doença debilitante, a LC acarreta perda de peso, redução da lactação e perda do valor comercial das peles. Assim, os prejuízos gerados por esta zoonose são de considerável extensão, afetando uma cultura de subsistência e básica para o pequeno produtor nordestino (DORELLA *et al.*, 2006; O'REILLY *et al.*, 2010).

A antibioticoterapia tem sido uma das estratégias utilizadas para o controle da LC, entretanto o tratamento é de longa duração e com custo elevado. Mesmo sendo uma bactéria sensível aos mais variados tipos de antibióticos, a terapia em questão se torna ineficiente em situações de infecção com formação de biofilme (OLSON *et al.*, 2002) e em abscessos encapsulados (BAIRD e FONTAINEY, 2007). Desta forma, vários tratamentos alternativos têm sido propostos como alternativas aceitáveis à abertura, drenagem e limpeza das lesões, mas sem maiores sucessos (SANTIAGO *et al.*, 2013).

A própolis surge como um tratamento alternativo contra doenças infecciosas graças ao seu alto potencial biológico. As atividades antimicrobiana, cicatrizante, anti-

inflamatória e imunomoduladora são atribuídas a uma grande quantidade de compostos, principalmente os flavonóides e ácidos fenólicos e seus ésteres (WAGH *et al.*, 2013).

Devido ao possível desenvolvimento de resistência aos medicamentos por bactérias, a própolis pode ser uma opção viável de tratamento, uma vez que, esta atividade biológica deve-se ao sinergismo de vários compostos químicos do extrato e, uma possível combinação com agentes antimicrobianos, pode permitir doses menores de antibiótico, potencializando a ação da droga (NETO *et al.*, 2017). Por isso, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos antimicrobianos de diferentes tipos de extrato de própolis em *C. pseudotuberculosis*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a resistência/susceptibilidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis* perante diferentes tipos de extratos de própolis obtidos pelos métodos de extração convencional e supercrítico.

Objetivos específicos

- a) Verificar a susceptibilidade de isolados de *C. pseudotuberculosis* perante extratos etanólicos e supercríticos de própolis vermelha;
- b) Verificar susceptibilidade de isolados de *C. pseudotuberculosis* perante extratos etanólicos de própolis verde e marrom;
- c) Verificar a susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* perante diversos antibióticos utilizados rotineiramente pelo método de difusão em disco;
- d) Verificar a susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* perante diversos antibióticos pelo método de microdiluição em caldo;

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis foi descrita pela primeira vez pelo microbiologista e veterinário francês Edmond Nocard, em 1888, sendo originalmente denominado bacilo de Preisz-Nocard, e em seguida *Corynebacterium ovis*. A partir de 1899, o agente foi isolado e examinado com mais frequência em ovelhas e cabras e, em 1918, Ebersson classificou a bactéria como conhecemos atualmente (LUCAS et. al., 2009).

C. pseudotuberculosis pertence ao gênero *Corynebacterium*, o qual está incluído em um grupo supragenérico dos Actinomicetos que também inclui os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Este grupo, chamado CMNR, é bastante heterogêneo, porém a maioria destas espécies compartilham características em comum, tais como a organização da parede celular, compostas principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos, bem como o elevado teor de guanina-citosina (G + C) do genoma (47-74%) (DORELLA et. al., 2006).

Dentro deste gênero, destacam-se *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, que possuem grande importância em saúde humana e veterinária. *C. diphtheriae* é o agente etiológico da difteria. *C. ulcerans* é considerado um importante patógeno oportunista em infecções hospitalares, e também pode causar difteria. *C. pseudotuberculosis* tem grande importância veterinária por causar a linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes (WINDSOR et al., 2016).

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno Gram-positivo intracelular facultativo que exhibe formas pleomórficas, que variam desde cocóides a bastões filamentosos medindo cerca de 0,5 µm a 0,6 µm por 1 µm a 3 µm em tamanho. Esta bactéria não possui cápsula, não esporula e é imóvel; contudo, possui fímbrias. É

anaeróbia facultativa e as condições ótimas de crescimento são a 37°C em pH entre 7.0 e 7.2. Tem um crescimento inicialmente espaçado na superfície do ágar e, em seguida, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado (DORELLA *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2016). O crescimento em meio líquido desenvolve-se como um biofilme na superfície, sem turvação média. Este filme é desfeito por agitação, formando flocos que precipitam. A formação da película é atribuída a lipídeos de superfície, e a quantidade destes lipídeos na membrana celular está diretamente correlacionada com a espessura do biofilme e a virulência da cepa bacteriana (MOURA COSTA, 2002).

Destaca-se ainda que esse microrganismo é exigente do ponto de vista nutricional, crescendo bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI ou caldo BHI ou enriquecidos com soro animal. Produz β -hemólise característica em ágar sangue que pode não aparecer até 48 a 72h de incubação (MOURA COSTA, 2002), porém largas zonas de hemólise se desenvolvem na presença do *Rhodococcus equi* no teste CAMP (OLIVEIRA *et al.*, 2014a).

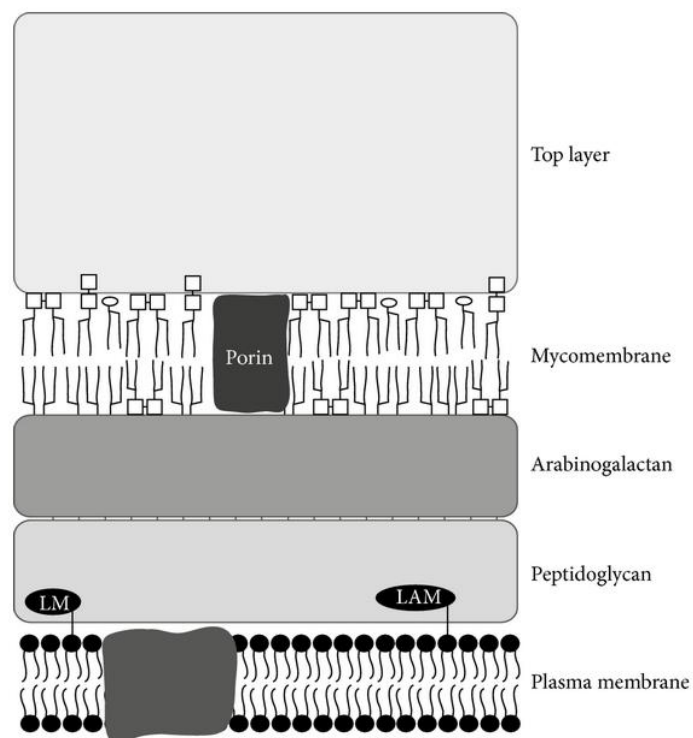
Além das características morfotintoriais e de crescimento, o *C. pseudotuberculosis* é caracterizado por provas bioquímicas, tais como produção de catalase, produção de urease e fermentação de carboidratos sem produção de gás como: maltose, manose, glicose, galactose (variável); não fermenta lactose; não tem atividade proteolítica, não hidrolisando a gelatina ou a caseína, e é oxidase negativa (MOURA-COSTA, 2002).

A redução de nitrato em nitrito caracteriza cepas que infectam principalmente equinos (*biovar equi*), enquanto que as cepas que infectam caprinos e ovinos (*biovar ovis*) são principalmente nitrato negativo e resistente à estreptomicina. Os bovinos são infectados por ambos biovars nitrato redutoras e não redutoras (SONGER *et al.*, 1988; SUTHERLAND *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 2013a; BARAÚNA *et al.*, 2017).

2. Parede Celular

A maioria das espécies do gênero *Corynebacterium* são caracterizadas por uma arquitetura complexa da parede celular: (i) uma membrana plasmática, composta principalmente de fosfolípidios, montados em uma bicamada lipídica, que também contém outros lípidios polares, além de proteínas cruciais para processos de transporte da célula.; (ii) uma camada de peptidoglicano, que está ligada covalentemente a arabinogalactanos e que pode conter outros resíduos de açúcar e ácidos corinemicólicos; e (iii) uma camada de heteropolissacarídeos. A camada externa de ácidos micólicos é funcionalmente equivalente à membrana externa de bactérias Gram-negativas. Na camada superior é encontrado material de superfície externa composto de polissacarídeos, glicolípídeos e proteínas livres, incluindo proteínas da camada S, pili e outras proteínas de superfície (DAFFÉ, 2005; BURKOVSKI *et al.*, 2013). Uma representação dessa organização é mostrada na **Figura 1**.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de envelope celular das corinebactérias.



Fonte: Adaptado de BURKOVSKI *et al.*, 2013.

A análise química dos polissacarídeos corinebacterianos mostrou que a composição do açúcar dos constituintes mais externos da grande maioria das espécies analisadas é semelhante à das micobactérias. Os polissacarídeos são compostos de 10-20% de arabinose, 20-35% de manose e 50-70% de glicose. Análises eletroforéticas, semelhantes às de amostras autênticas de lipoarabinomanano (LAM) e lipomanano (LM) micobacterianos sugerem a presença de substâncias semelhantes a LAM e LM em corinebactérias (PUECH *et al.*, 2001).

A membrana externa bacteriana deve ser seletivamente permeabilizada para permitir o transporte de moléculas para o crescimento bacteriano; entretanto, a barreira de permeabilidade da camada de ácidos micólicos atua impedindo a absorção desses nutrientes por transportadores de membrana plasmática. Para este fim, as proteínas porinas são inseridas na membrana. Em geral, estas são funcionalmente equivalentes a proteínas porinas de bactérias Gram-negativas (BURKOVSKI *et al.*, 2013).

3. Linfadenite Caseosa

A LC, conhecida popularmente como “mal do caroço”, “caroço”, ou “falsa tuberculose”, é uma doença infectocontagiosa, crônica, debilitante, causada por *C. pseudotuberculosis*. Eventualmente, tem sido encontrada em bovinos e equinos, causando a acne contagiosa e a linfangite ulcerativa, respectivamente (YERUHAM *et al.*, 1996; DOHERR *et al.*, 1998; HOMMEZ *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2013b; NORMAN *et al.*, 2014; RHODES *et al.*, 2015). Suínos foram descritos recentemente como hospedeiros da bactéria (OLIVEIRA *et al.*, 2014a), porém é em ovinos e caprinos que assume importância econômica e sanitária (DORELLA *et al.*, 2006; SELLERA *et al.*, 2016).

A LC é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais, como também em diversos órgãos (VOIGT *et al.*, 2012; OREIBY *et al.*, 2014) com período de incubação longo, o qual pode variar de 2 a 6 semanas, tornando difícil a segregação dos animais infectados dos não infectados (CHIRINO-ZARRAGA *et al.*, 2006). Estas duas manifestações da

doença podem ocorrer concomitantemente, levando a perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade e eficiência reprodutiva dos animais infectados (DORELLA *et al.*, 2006a; O'REILLY *et al.*, 2010), quando a bactéria coloniza órgãos reprodutivos e nódulos linfáticos associados, causando infertilidade por um longo período de tempo (LATIF *et al.*, 2015; OTHMAN *et al.*, 2016).

Esses prejuízos econômicos são causados, devido ao caráter debilitante da doença, pela perda de peso e redução da lactação. Assim, os danos gerados por esta zoonose são de considerável extensão, porque afeta uma cultura de subsistência, básica para o pequeno produtor nordestino, por exemplo. A doença também compromete a pele dos animais, e os prejuízos atingem a indústria de peles. Os curtumes regionais apresentam prejuízo significativo decorrente das lesões de pele geradas pelos granulomas em linfonodos superficiais, pois comumente a fragilidade da pele afetada só é percebida após o processamento já estar quase concluído (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Sendo uma doença que acomete principalmente caprinos e ovinos, é importante considerar a LC como um problema de saúde pública. Bastos *et al.* (2012) revisaram 32 casos relatados na literatura científica de infecção em humanos em diversos países, e recentemente foi descrito um quadro de pneumonia em estudante de medicina veterinária com evidência molecular de aquisição durante o trabalho em laboratório (HEGGELUND *et al.*, 2015).

4. Epidemiologia

A incidência da LC é relatada em diversos países, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Tunísia, Índia, Estados Unidos, Canadá e Brasil (AL-RAWASHDEH & AL-QUDAH, 2000; CONNOR *et al.*, 2000; BEN SAID *et al.*, 2002; BINNS *et al.*, 2002; ARSENAULT *et al.*, 2003; SEYFFERT *et al.*, 2010; TRIPATHI *et al.*, 2016). No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos esteja infectada e que a prevalência clínica possa atingir 30% dos animais. Os estados da região Nordeste são os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos caprinos do país (IBGE, 2015).

Andrade *et al.* (2012), estudando a ocorrência e os fatores de risco associados à infecção por *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido da Paraíba, identificaram que 7,7% (49/640) dos animais apresentavam evidências clínicas de linfadenite caseosa, e constataram que *C. pseudotuberculosis* foi o agente mais frequentemente isolado (68,2%). Em Minas Gerais, um levantamento soropidemiológico realizado por Seyffert *et al.* (2010) apresentou uma elevada soroprevalência (78,9%) de animais positivos para LC. No Distrito Federal, a soroprevalência da linfadenite caseosa em rebanhos comerciais de ovinos no Distrito Federal, determinada através de ELISA indireto, foi de 44,0% (CARMO *et al.*, 2012).

A LC é mais prevalente em ovinos se comparada a caprinos; contudo, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, o que reflete maior exposição aos fatores de risco. Em ovinos, a raça Merino e seus mestiços são as mais propensas, o que pode ser explicado pela presença de uma pele mais fina e apresentando dobras. Estas características propiciam maiores lesões por ocasião da tosquia (ALGAABARY *et al.*, 2002).

A transmissão ocorre por contato direto com secreções ou por materiais contaminados. A entrada da bactéria no organismo é facilitada por feridas na pele; contudo, pode penetrar até mesmo pela pele intacta (WILLIAMSON, 2001; ANDRADE *et al.*, 2012). Ovelhas infectadas podem transmitir a infecção a um grande número de animais em um curto período de tempo sob condições de contato próximo e fluxo de ar reduzido em galpões cobertos (OREIBY *et al.*, 2014).

A frequência mais elevada de infecção em linfonodos parotídeos dá uma indicação de que a ingestão de alimentos, a tosquia e a descorna têm um papel considerável na transmissão de LC em ovinos (O'REILLY *et al.*, 2008). Outros fatores de risco incluem a falta de higiene das instalações, o contato direto entre animais infectados e com a poeira (O'REILLY *et al.*, 2008). No caso da caprinovinocultura brasileira, um importante fator de risco é a vegetação presente no nordeste brasileiro, caracterizada pela presença de numerosas plantas cactáceas que podem provocar lesões na pele dos animais (ANDRADE *et al.*, 2012).

5. Patogenia e Diagnóstico

Após a entrada da bactéria no hospedeiro, esta se dissemina rapidamente para o linfonodo de drenagem local, onde se desenvolvem múltiplos granulomas microscópicos, que vão crescendo e se unindo até formar um granuloma maior. Isto é, algumas vezes, seguido de uma extensão da infecção para sítios secundários através do sangue ou do sistema linfático, levando à formação de lesões similares em outros órgãos, sendo o pulmão o órgão mais acometido depois dos linfonodos (BAIRD & FONTAINE, 2007). A forma de contágio ainda é controversa, mas, provavelmente, ocorre através do contato entre o drenado da lesão e a pele ou mucosas íntegras dos animais sadios, ou onde existem soluções de continuidade (WASHBURN *et al.*, 2013), ou, ainda, através de aspiração de aerossóis (BASTOS *et al.*, 2011).

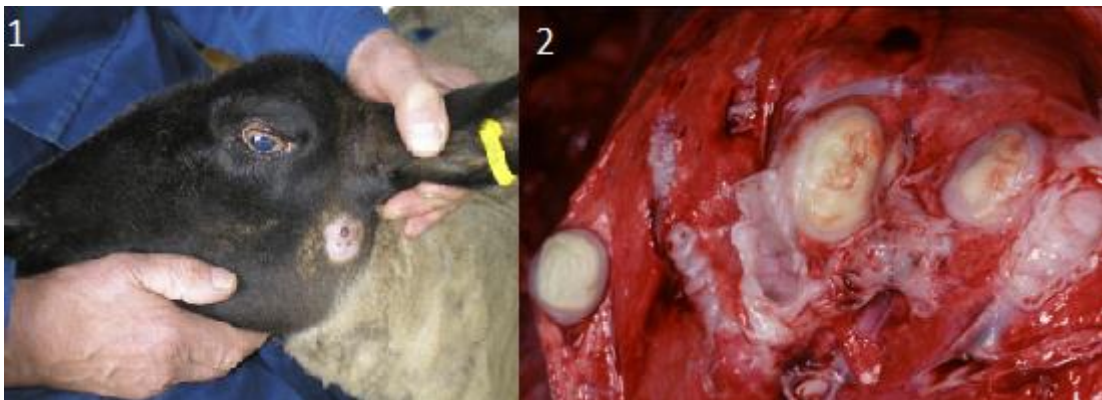
A disseminação da bactéria no organismo hospedeiro depende, principalmente, da atividade da fosfolipase D (MOURA-COSTA, 2002). A fosfolipase D é uma fosfolipase esfingomielina-específica (BAIRD & FONTAINEY, 2007) que promove a hidrólise das ligações éster da esfingomielina da membrana celular dos mamíferos, possibilitando a disseminação da bactéria do sítio inicial de infecção para sítios secundários (DORELLA *et. al.*, 2006). Esta é a atividade biológica mais importante como fator de virulência (BAIRD & FONTAINEY, 2007). Dano e destruição de macrófagos em caprinos são observados durante a infecção com *C. pseudotuberculosis* (DORELLA *et. al.*, 2006) devido à inibição da fusão do fagossoma com o lisossoma operada pelos lipídeos de parede. A infecção, seja em linfonodos, seja em outros órgãos, evolui com fagocitose por neutrófilos e macrófagos, multiplicação intracelular do *C. pseudotuberculosis* e degeneração e morte das células hospedeiras (DORELLA *et. al.*, 2006a).

A incapacidade por parte dos macrófagos de eliminar as bactérias pode ser devida, além da presença da camada lipídica, à incapacidade destes em produzir óxido nítrico. Com a morte dos macrófagos, há liberação da bactéria e formação de uma lesão necrótica, ficando esta livre para se disseminar para outros órgãos. Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre a formação de granulomas. A lesão evolui com a segregação de microrganismos e células degeneradas em necrose caseosa por

camadas de células epiteliais, linfócitos e macrófagos e, posteriormente, tecido fibroso (KURIA *et al.*, 2001).

As lesões ocorrem em duas formas principais: externa (também conhecida como superficial ou cutânea) e visceral. A forma externa é caracterizada pela formação de lesões nos linfonodos superficiais com tamanhos variáveis e em diferentes locais que podem ser fechados ou abertos, com conteúdo coloração amarelo-esverdeado ou branco-amarelado de consistência variando de purulenta a caseosa. Os gânglios linfáticos parotídeos são mais comumente afetados nos ovinos, enquanto os linfonodos cervicais superficiais são os mais comumente afetados nos caprinos (AL-GABARY *et al.*, 2009). A forma visceral está associada a abscessos nos gânglios linfáticos internos e parênquima pulmonar. As lesões podem ser encontradas no fígado, nos rins ou no úbere, e mais raramente no coração, nos testículos, no escroto, no útero, nas articulações, no cérebro ou na medula espinha (BAIRD e FONTAINE, 2007; FERRER *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012). Exemplos de lesão são encontrados na **Figura 2**.

Figura 2 - (1) Lesão de LC no linfonodo parotídeo de um ovino adulto; (2) lesão de LC no parênquima pulmonar de ovino.



Fonte: Adaptado de BAIRD e FONTAINE (2007)

O diagnóstico da LC é fundamentado nos achados clínico-epidemiológicos, onde se observam a formação de lesões típicas e/ou cicatrizes nos linfonodos superficiais (AZEVEDO *et al.*, 2012). Os animais infectados que não apresentam sintomas clínicos são uma fonte de infecção para animais saudáveis, por isso vários métodos sorológicos foram desenvolvidos para superar o problema do diagnóstico subclínico da LC. Alguns testes sorológicos foram descritos como sendo aplicáveis ao diagnóstico de LC, tais como um ensaio de microaglutinação, teste de imunodifusão, teste sinérgico de inibição de hemólise, dot-blot, Western blotting, ensaio de fixação do complemento, teste de hemaglutinação indireta e PCR (ÇETINKAYA *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2012). Alguns testes, como o ELISA, foram relatados por serem relativamente eficazes em programas do controle da enfermidade (DERCKSEN *et al.*, 2000; REBOUÇAS *et al.*, 2013). Recentemente, a detecção de uma resposta imune mediada por células contra *C. pseudotuberculosis*, utilizando um ELISA para detectar interferon gama (IFN- γ), é uma abordagem direta e aparentemente mais confiável para detecção de ovelhas infectadas com LC do que métodos existentes baseados em anticorpos (PRESCOTT *et al.*, 2008).

Os testes sorológicos podem ter especificidade e sensibilidade diferentes quando comparados com a cultura bacteriológica (RIBEIRO *et al.*, 2013), possivelmente devido a reações cruzadas com espécies bacterianas patogênicas, tais como *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* e *Fusobacterium necrophorum* (BAIRD e FONTAINE, 2007). Por isso, o isolamento de *C. pseudotuberculosis* diretamente do material purulento de linfonodos, permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico (RIBEIRO *et al.*, 2011, WILLIAMSON, 2001). As amostras de linfonodos com lesões são coletadas para exame de esfregaço e exame microbiológico, seguida por identificação bioquímica de isolados (URAL *et al.*, 2008).

Um teste bioquímico bem estabelecido para a identificação de bactérias corineformes é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France). Esse método consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 horas. O sistema contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, α -glucosidase, N-acetilglucosaminidase, β -

glucoronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose e glicogênio).

6. Tratamento

Atualmente, o tratamento da LC baseia-se na drenagem e limpeza das lesões, utilizando solução de iodo a 10%, em estágio avançado da doença. No entanto, esta técnica representa altos riscos de contaminação ambiental, seja por ruptura espontânea e inesperada de lesão ou por simples exposição do patógeno ao ambiente externo através de um material contaminado. No estágio de desenvolvimento da doença, a aplicação de tintura de iodo a 10% e hipoclorito de sódio a 2,5% nas lesões de animais afetados pelo LC não é 100% eficaz para controlar a enfermidade, além de serem responsáveis pelas reações de dor e edema na região dos gânglios linfáticos (SANTIAGO *et al.*, 2013).

O tratamento clínico da LC é geralmente refratário à terapia antibiótica, provavelmente devido à espessa cápsula formada em torno das lesões típicas e à natureza espessa e caseosa do conteúdo contido dentro da cápsula. Também, os antibióticos eliminam apenas o patógeno das lesões superficiais, mas ainda podem existir lesões e/ou abscessos internos (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Existem alternativas aceitáveis à abertura e drenagem para o tratamento de ovinos e caprinos com linfadenite caseosa. WASHBURN *et al.* (2009) demonstraram a resolução de lesões de infecção um mês após o tratamento com o uso de tulatromicina e penicilina; no entanto, o uso dessas drogas exige tempo de carência prolongados antes que o leite ou a carne sejam vendidos para consumo humano.

Recentemente, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) surge como um tratamento alternativo para LC. Sua ação resulta da interação de um fotossensibilizador, luz visível e oxigênio molecular. No estudo realizado por Sellera *et al.* (2016) utilizando a APDT, todos os animais tratados responderam ao protocolo proposto. Após uma semana, não foram observados sinais inflamatórios e exsudatos purulentos. Houve

redução de tamanho de todos os linfonodos tratados, voltando aos seus tamanhos normais após duas semanas (tempo médio de cura de 15,3 dias). Além disso, não foram observadas recorrências nos linfonodos tratados durante seis meses seguidos e não foram observados efeitos adversos nos animais tratados durante o período experimental.

7. Prevenção e Controle

A erradicação da LC torna-se difícil em virtude da fraca resposta ao tratamento, à capacidade de persistir no meio ambiente do patógeno e na dificuldade em detectar os animais com infecção subclínica nos rebanhos. A prevenção tem sido a melhor alternativa, a qual pode ser feita através de inspeções periódicas do rebanho, isolamento dos animais doentes, tratamento e desinfecção de qualquer tipo de ferimento superficial, além da limpeza das instalações (WILLIAMSON, 2001; COLOM-CADENA *et al.*, 2014). A retirada ou mesmo o sacrifício de animais soropositivos e com lesões superficiais do rebanho é sugerida como medida de controle na fase inicial da infecção e com menos de 60% de prevalência (O'REILLY *et al.*, 2010). Entretanto a adoção de medidas drásticas, como a eliminação de animais doentes (sintomáticos), ou daqueles que apresentarem testes positivos em testes diagnósticos, pode resultar na eliminação de animais falso-positivos e não infectados (MENZIES *et al.*, 2004; DORELLA *et al.*, 2009).

Considerando as dificuldades da implantação das estratégias que previnam a contaminação e sua disseminação nos nossos rebanhos, associada ao fato da inviabilidade da antibioticoterapia, a medida com melhor custo-benefício contra a introdução da LC no plantel seria a imunização. A utilização de vacinas foi comprovada nos últimos 120 anos como sendo o método mais eficiente e efetivo no controle de doenças infecciosas (DORELLA *et al.*, 2009).

Vários relatos na literatura mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana e uma mistura de componentes

celulares e sobrenadante (EGGLETON *et al.*, 1991; ELLIS *et al.*, 1991; FONTAINE *et al.*, 2006; COLOM-CADENA *et al.*, 2014; MOUSSA *et al.*, 2016; BRUM *et al.*, 2017). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

A principal medida de controle se baseia em procedimentos de manejo cujo objetivo é evitar a disseminação bacteriana. Todos os instrumentos de uso comunitário devem ser mergulhados em um desinfetante potente após contato com cada animal, como, por exemplo, aqueles baseados em amônia quaternária. Galpões, troncos de tosquia e baias de contenção devem ser bem higienizados e desinfetados (WINDSOR *et al.*, 2011).

Os animais também devem ser alvos de cuidados. A tosquia deve ser iniciada pelos animais mais jovens, evitando contato entre os animais. Os que possuem lesões palpáveis devem ser os últimos a serem manipulados. As feridas na pele dos animais devem ser desinfetadas. Agentes bactericidas devem ser adicionados à água a ser utilizada no banho dos animais. No caso de caprinos confinados, evitar equipamentos que constituam possíveis fontes de traumas, como arames. Além disso, deve-se adquirir animais com o histórico livre da patologia e realizar a quarentena dos mesmos (AL-GAABARY *et al.*, 2009).

8. Própolis

A própolis é uma substância resinosa, ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas *Apis mellífera* a partir de diferentes exsudatos vegetais. Tem sido utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade devido ao seu largo espectro de atividade biológica (MARCUCCI *et al.*, 2001).

A composição da própolis e suas propriedades físico-químicas, atividades biológicas e utilizações terapêuticas dependem da vegetação onde as colmeias são colocadas, do clima e da variedade da rainha (QUIROGA *et al.*, 2006). De uma maneira geral, a composição da própolis inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de

pólen e metabólitos secundários (MATSUNO, 1995; MIYATAKA *et al.*, 1997). Pelo menos 300 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis), terpenos, b-esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (MARCUCCI *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2014).

A própolis brasileira é bastante diversificada na composição química, devido à rica biodiversidade do país. Park *et al* (2002) classificaram a própolis brasileira em doze grupos distintos de própolis de acordo com propriedades físico-químicas e relacionadas a locais geográficos: cinco no grupo sul do Brasil, um no grupo sudeste do Brasil e seis no grupo nordestino. A principal origem botânica das própolis brasileiras do Sul, Nordeste e Sudoeste são de resinas de *Populus* sp., *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente.

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae), popularmente conhecida como "alecrim-do-campo", é uma planta nativa do Brasil e é considerada a principal fonte botânica de própolis verde, predominante no Sudeste do Brasil. Abelhas *Apis mellifera* africanizadas foram vistas em plantas alecrim fragmentando e manipulando brotos e folhas, sendo o produto final uma massa de material resinoso esverdeado (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A própolis verde é atualmente a própolis brasileira mais exportada e suas atividades biológicas devem-se aos altos níveis de ácidos *p*- cumáricos prenilados e, principalmente a Artepillin C, que também está presente em *Baccharis dracunculifolia* DC (VEIGA *et al.*, 2017). Estudos fitoquímicos revelam a presença de diferentes compostos bioativos responsáveis pelas atividades antibacteriana, antioxidante e antifúngica, como os compostos fenólicos, ácido cinâmico e derivados, flavonóides, ácido benzóico, aromáticos não hidroxilados, prenilados, alcanos, terpenóides e ésteres alifáticos (PARK *et al.*, 2004; BANKOVA *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2008; FILHO *et al.*, 2008). A atividade biológica de própolis verde tem sido utilizada para avaliação de parâmetros imunológicos, demonstrado um efeito positivo contra o envelhecimento na imunidade inata e adaptativa em camundongos (GAO *et al.*, 2014). Outros estudos mostraram que o extrato de própolis verde possui propriedades

anti-inflamatórias, inibindo citocinas pró-inflamatórias, aumentando a ação de citocinas anti-inflamatórias, o que sugere que esse extrato tem atividade imunomoduladora (PAULINO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2012).

A própolis marrom é encontrada nas regiões Sul (estados do Paraná e Santa Catarina) e Centro-Oeste (Mato Grosso) do Brasil (SAWAVA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2016b). A fonte botânica da própolis marrom é bastante variada, sendo proveniente de florada de plantas apícolas *Luehea* sp. (açoita-cavalo), *Piptadenia falcata* (angico-do-cerrado), *Tabebuia* spp. (ipês), *Tabebuia caraíba* (paratudo), *Vernonia* spp. (assa-peixes) e *Cecropia pachystachya* (embaúba).

Ainda que em menor quantidade quando comparado com outros tipos de própolis, a composição química de própolis marrom indica a presença de compostos fenólicos, como derivados de ácidos benzóico e cinâmico, flavonóides e compostos fenólicos prenilados e Artepillin C. Estudos mostram que os extratos de pode atuar de forma seletiva contra células tumorais e mostrar atividade potencial antitumoral. O baixo potencial antioxidante resulta em maiores concentrações do extrato para a inibição do crescimento antimicrobiano (MACHADO *et al.*, 2016a; MACHADO *et al.*, 2016b). A atividade biológica do extrato de própolis marrom tem sido evidenciada no estudo realizado por Pimenta *et al.* (2015), ao avaliarem o potencial *in vitro* da própolis como medicação intracanal contra *Enterococcus faecalis*. Neste estudo, o extrato de própolis mostrou a capacidade antibacteriana com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 1000 mg/mL. Outros estudos mostram a ação antiproliferativa do extrato de própolis marrom cubano em células de câncer de mama humano (POPOLO *et al.*, 2009) e atividade antifúngica contra *Sporothrix brasiliensis* resistente a itraconazol (WALLER *et al.*, 2017).

Recentemente, um novo tipo de própolis brasileira, popularmente conhecida como "própolis vermelha", foi identificada na região Nordeste do Brasil e tem sido relatada em outros países, como Cuba (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; PICCINELLI *et al.*, 2011), México (LOTTI *et al.*, 2010), China (IZUTA *et al.*, 2009) e Venezuela (TRUSHEVA *et al.*, 2004). Abelhas *Apis mellifera* costumam visitar *Dalbergia ecastophyllum* para coletar os exsudatos resinosos avermelhados na superfície e nos orifícios dos seus ramos. A própolis avermelhada coletada por essa espécie de abelha,

está em colmeias localizadas em arbustos perenes e lenhosos ao longo do mar e margens dos rios nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba no Nordeste do Brasil (DAUGSCH *et al.*, 2008).

Após o monitoramento das visitas de abelhas *Apis mellifera* em regiões de manguezais no estado de Alagoas, Silva *et al.* (2008) realizaram um estudo com o objetivo de identificar a fonte vegetal e a composição química da nova própolis vermelha brasileira, através de análise fitoquímica exploratória da microflora de resinas de 20 amostras plantas nas áreas de manguezais. Os resultados de espectroscopia por UV-VIS, RP-HPTLC, RP-HPLC e GC/MS, concluíram que a resina da *Dalbergia ecastophyllum* é a fonte botânica da própolis vermelha brasileira, e que esta pode ser considerada um 13º tipo de própolis brasileira. O perfil químico de *Dalbergia ecastophyllum* é semelhante ao perfil químico da própolis vermelha, sendo os principais constituintes os isoflavonóides medicarpina e 3-Hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, sendo este o último representando mais de 60% da sua composição. Esse tipo de própolis tem sido alvo de estudos por vários grupos de pesquisa, por ser uma fonte promissora de novos compostos bioativos, rica em compostos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, triterpenóides, benzofenonas preniladas, epóxido de naftoquinona, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, ácido *p*- cumárico, vitexina, luteolina, rutina, quercetina e apigenina, e demonstrando atividades antioxidantes, citotóxica, antibacterianas e antifúngicas (TRUSHEVA *et al.*, 2006; NETO *et al.*, 2017). O perfil fitoquímico do extrato etanólico da própolis vermelha realizado por Mendonça *et al.* (2015) indicaram a presença de taninos, catequinas, calcones, auronos, flavononas, flavonóides, xantonas, triterpenóides pentacíclicos e gutiferonas. As frações de hexano, clorofórmio e acetato de etilo apresentaram atividade antioxidante. O extrato etanólico da própolis vermelha também exibiu níveis elevados de citotoxicidade em todas as linhas de células tumorais humanas testadas.

Nos últimos anos, a própolis tem sido o objeto de estudos intensivos, destacando as suas propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antibacteriana (VELAZQUEZ *et al.*, 2007), antiviral (SCHNITZLER *et al.*, 2010), antioxidante (MOREIRA *et al.*, 2008), hepatoprotetora (BANSKOTA *et al.*, 2001) e anticancerígena (VALENTE *et al.*, 2011). As propriedades antibióticas da própolis têm demonstrado

uma eficiente atividade a diversos gêneros de bactérias, sendo as bactérias Gram negativas menos sensíveis do que as bactérias Gram positivas (SANTOS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2012; LOPEZ *et al.*, 2015), graças à parede celular complexa e composta de dupla camada de fosfolipídios ligada à membrana interna por lipopolissacarídeos (BROWN *et al.*, 2015).

É importante destacar que a estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas permite que moléculas hidrofóbicas, como os compostos fenólicos, penetrem mais facilmente nas células e atuem tanto na parede celular como no interior do citoplasma, levando a alterações irreversíveis nas propriedades da membrana (carga, permeabilidade intracelular e extracelular e propriedades físico-químicas) através de alterações de hidrofobicidade, diminuição da carga superficial negativa e ocorrência de ruptura local ou formação de poros nas membranas celulares com consequente vazamento de células intracelulares essenciais (GARDJEVA *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2013; NAZARRO *et al.*, 2013). As diferenças na sensibilidade bacteriana podem também estar associadas à composição química e a origem botânica da própolis, bem como a espécie das abelhas, o apiário de coleta, as estações do ano e a região de coleta (SFORCIN *et al.*, 2000; KARTAL *et al.*, 2003; BONVEHÍ & GUTIÉRREZ, 2012; WAGH *et al.*, 2013).

9. Obtenção de Extratos de Própolis

Os solventes mais comuns utilizados para a extração da própolis e dos seus componentes específicos são água, metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, éter e acetona (KUMAR *et al.*, 2008). Destes, o etanol é o mais adequado para a obtenção de extratos de própolis pobre em cera e ricos em compostos biologicamente ativos (KUBILINE *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2015).

Os compostos naturais com atividade biológica podem ser obtidos por diversas técnicas convencionais, tais como Soxhlet e maceração, ou por métodos alternativos tais como extração de fluido supercrítico (SFE). A obtenção de compostos com alto potencial biológico presentes na matéria prima depende da viabilidade do processo de

extração, que está relacionada ao rendimento dos diferentes métodos e da qualidade do produto (BISCAIA *et al.*, 2009).

O uso de fluidos supercríticos na extração de produtos naturais apresenta um potencial considerável em processos tecnológicos, com uma série de vantagens sobre solventes líquidos. Apresenta características desejáveis, tais como alta flexibilidade, ajustando o poder do solvente e a seletividade do processo; alta qualidade do produto devido à baixa utilização de solventes orgânicos poluentes; e custos reduzidos da eliminação do solvente. O CO₂ é o solvente mais utilizado porque não é tóxico, não inflamável e tem uma temperatura crítica baixa e uma pressão crítica intermédia (REVERCHON *et al.*, 2006; CABRAL *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2013).

O uso da SFE em própolis é atraente devido à natureza resinosa deste produto e à presença de compostos lipofílicos que, do ponto de vista qualitativo, apresenta uma composição diferente de moléculas bioativas em comparação com os extratos obtidos por técnicas convencionais (ZORDI *et al.*, 2014). De fato, o estabelecimento de parâmetro de temperatura, pressão e concentração de co-solvente para a extração de própolis, usando dióxido de carbono como fluido supercrítico, tem sido importante para obtenção de compostos com alto valor agregado. Isto é bastante evidenciado no estudo realizado por Machado *et al.* (2015), após concluírem que a presença do co-solvente no processo SFE, temperatura de 50°C e pressão a 350 bar tem um aumento significativo na capacidade de extração de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante da própolis verde brasileira.

A extração supercrítica tem sido extremamente útil para a caracterização química, avaliação da capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana de extratos de própolis marrom, verde e vermelha de diferentes regiões do Brasil. Os extratos obtidos por SFE podem ter uma concentração maior de Artepillin C e até quatro vezes superior de ácido p-cumárico, em comparação com os extratos etanólicos, forte atividade antioxidante e atividade antimicrobiana significativa (MACHADO *et al.*, 2016a; DANTAS SILVA *et al.*, 2017).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis

A obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis brasileira do presente estudo foram descritas por Machado *et al.* (2016a). As amostras de própolis vermelha (RAL) foram originadas do estado de Alagoas, enquanto que as amostras de própolis marrom (BSC) e verde (GPR) originárias dos estados de Santa Catarina e Paraná, respectivamente. Aproximadamente 700-1000g de amostras de própolis foram doadas pela empresa Apis Nativa Produtos Naturais (Prodapys-Santa Catarina-Brasil), no período de julho a setembro de 2013.

As amostras de própolis foram trituradas em um moedor (Cadence-Brasil) e posteriormente peneiradas (malha 60) para obter uma granulometria adequada (aproximadamente 0,250 mm), aumentando assim a área superficial, e homogeneizada para iniciar os processos de extração. Os teores de umidade, proteína, conteúdo de cinzas, lipídios totais, conteúdo mineral e a quantificação da atividade da água são descritos nas **Tabelas 1 e 2**. Na **Tabela 3** é apresentada a composição química dos extratos de própolis vermelha, verde e marrom utilizados neste estudo.

Tabela 1 - Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Umidade (%)	Sólidos Totais (%)	Cinzas Totais (%)
RLA	7.03±0.42	92.97±0.42	0.96±0.03
GPR	7.13±0.12	92.87±0.12	3.15±0.03
BSC	7.07±0.10	92.93±0.10	1.73±0.19

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al.* (2016a)

Tabela 2 - Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Proteína (%)	Lipídios (%)	Aw (%)	Fibra (%)
RLA	2.30±0.05	66.33±0.01	0.689±0.01	7.66±0.90
GPR	9.98±0.83	48.72±1.29	0.688±0.02	20.89±1.39
BSC	3.90±0.49	74.31±5.69	0.657±0.02	7.29±0.30

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al.*, (2016a)

Tabela 3 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG / g), flavonóides (mg EQ / g), atividade antioxidante por DPPH (IC50) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (SCO₂).

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG / g)	Flavonóides (mg EQ/g)	DPPH(IC50)	ABTS (%) (Trolox 1 mg.ml ⁻¹)
RAL SCO ₂	157.16±0.01	40.65±0.01	183.11±0.31	82.80±3.50
RAL EtOH	198.77±0.01	58.19±0.01	44.29±0.29	98.20±1.30
GPR EtOH	179.52±0.01	39.90±0.01	157.39±0.26	89.90±1.80
BSC EtOH	117.03±0.01	27.97±0.01	163.00±0.311	89.80±1.20

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al.* (2016a)

2. Obtenção dos extratos de própolis

2.1. Extração etanólica convencional

Os extratos de própolis foram preparados de acordo Machado *et al.* (2016). Foram adicionados 15 ml de etanol (80%) em 2 g de própolis. A extração ocorreu em uma temperatura de 70°C durante 30 minutos sob agitação constante em uma

incubadora Shaker (MA 420 / MARCONI-Brasil), com rotação de 710 rpm. Em seguida, centrifugou-se o extrato (Centrifuga SIGMA 2-16 KL) a 8800 rpm durante 11 min a 5 ° C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um recipiente de 50 ml e foram adicionados 10 ml de etanol (80%) ao resíduo do tubo, onde a centrifugação foi repetida. Os sobrenadantes foram homogeneizados e mantidos a 50 ° C até estarem completamente secos. Em seguida, os extratos foram armazenados em tubos cobertos com folha de alumínio em condições atmosféricas inertes (N₂), a fim de evitar a degradação do material. As condições e identificação dos extratos são descritas na **Tabela 4**.

2.2. Metodologia de extração com fluido supercrítico (CO₂) utilizando etanol como co-solvente

As extrações foram realizadas na unidade de Extração Supercrítica (Supercritical Fluids SFT-110) do SENAI CIMATEC. A unidade é equipada com bomba para dióxido de carbono líquido, rotâmetro, cilindro de CO₂ (99% de pureza), totalímetro e uma célula de extração de 100 mL.

Inicialmente, para determinar a condição de extração que exercesse maior atividade antimicrobiana, amostras de própolis vermelha foram extraídas em temperaturas de 40°C e 50°C, pressões de 200 bar, 300 bar e 400 bar, S / F de 110 (massa de CO₂ [solvente] / massa de própolis [soluto]), 1% de co-solvente (etanol m / m), fluxo de CO₂ de 6 g / min e tempo total de extração de aproximadamente 2 h 30 min (MACHADO *et al*, 2015). No final do processo foram obtidos quatro extratos de própolis vermelhas nas seguintes condições: 50°C e 400 bar, 50°C e 200 bar, 40°C e 300 bar e 40°C e 400 bar (**Tabela 4**).

Tabela 4. Condições e identificação dos extratos etanólicos e supercríticos de própolis brasileira.

Amostra	Método de extração	Condições	Origem geográfica	Tipo
RAL SCO ₂ 1	Ext. Supercrítica	50°C, 400 bar	Alagoas	Vermelha
RAL SCO ₂ 2	Ext. Supercrítica	50°C, 200 bar	Alagoas	Vermelha
RAL SCO ₂ 3	Ext. Supercrítica	40°C, 400 bar	Alagoas	Vermelha
RAL SCO ₂ 4	Ext. Supercrítica	40°C, 300 bar	Alagoas	Vermelha
RAL EtOH	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Alagoas	Vermelha
GPR EtOH	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Paraná	Verde
BSC EtOH	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Santa Catarina	Marrom

3. Cepas Bacterianas

No presente estudo, foram utilizadas três cepas de *C. pseudotuberculosis*. Como padrão, foi utilizada a cepa de *C. pseudotuberculosis* chamada 1002, que foi o padrão utilizado no projeto de genoma da bactéria e a qual já tem o seu genoma sequenciado e depositado (GenBank número de acesso CP001809.2); a cepa VD57 de *C. pseudotuberculosis*, altamente patogênica, com genoma sequenciado, isolada de uma lesão granulomatosa de cabra no município de Juazeiro, Estado da Bahia (ALMEIDA *et al.*, 2016), e a cepa viscerotrópica N1 de *C. pseudotuberculosis*, isolada de uma ovelha em Mongomo, Guiné Equatorial (LOUREIRO *et al.*, 2016), a qual também tem o seu genoma sequenciado e depositado (GenBank número de acesso CP013146)

4. Ensaio de determinação da sensibilidade de isolados de *C. pseudotuberculosis* frente a antibióticos comerciais.

a) Metodologia da difusão em disco.

A avaliação da resistência ou susceptibilidade das cepas 1002, VD57 e N1 a antibióticos disponíveis comercialmente foi realizada inicialmente pela metodologia de difusão em disco, seguindo uma metodologia proposta por BAUER *et al.*, 1966, com algumas modificações. As cepas foram crescidas em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) acrescido de 0,1% de Tween 80 a 37°C por 24 horas. Após 24 horas, ajustou-se a turbidez da cultura em caldo BHI, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922 (CLSI, 2012).

Sucintamente, o inóculo foi semeado em superfície do ágar BHI em diferentes direções, cobrindo toda a superfície da placa. Aguardou-se 5 minutos para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar para serem posteriormente aplicados, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos impregnados com os antibióticos. As placas foram invertidas 15 minutos após a colocação dos discos e incubadas por 48 horas em estufa a 37°C. Os halos de inibição formados foram medidos e comparados a padrões pré-estabelecidos para determinação de susceptibilidade a antibióticos de *C. pseudotuberculosis* (CLSI, 2012).

Os antibióticos utilizados no ensaio foram aqueles usados rotineiramente para bactérias Gram-positivas, os quais são: ampicilina, amoxicilina, oxacilina, penicilina, cefoxitina, cefalotina, amicacina, gentamicina, neomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, doxiciclina, norfloxacin, bacitracina e sulfazotrim. O experimento foi realizado em triplicata, e os resultados foram expressos em médias das triplicatas.

b) Ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) frente a antibióticos comerciais.

Os solventes e diluentes para a preparação de soluções padrão de agentes antimicrobianos são descritos pelo CLSI (2005). O caldo BHI com concentração final de Tween 80 a 0,5% foi utilizado como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade para *C. pseudotuberculosis*.

A metodologia da MIC foi realizada de acordo com NORMAN *et al.* (2014), com algumas modificações. Após a incubação, cada cepa isolada foi diluída em caldo BHI para alcançar, em espectrofotômetro, uma densidade óptica de 0,08-0,10 no comprimento de onda de 600 nm (ópticamente comparável à solução padrão McFarland de 0,5). Cada suspensão continha aproximadamente 3×10^6 UFC/mL de *C. pseudotuberculosis*. Em seguida, as suspensões foram imediatamente diluídas em caldo BHI para obter uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. Para atingir uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL nos poços da placa de cultivo, cada poço foi inoculado com 100 μ L do inóculo e 100 μ L de solução contendo o antimicrobiano. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

A MIC foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de impedir o crescimento microbiano. A partir dos poços do ensaio de determinação da MIC retirou-se uma alíquota de 20 μ L, a qual foi inoculada na superfície do ágar BHI. As placas foram incubadas a 37°C (2% de CO₂) e, após 48 horas, foi definida a MBC como a menor concentração do antimicrobiano capaz de causar a morte bacteriana. Os ensaios de MIC foram realizados em triplicata. Também foi realizado o controle do diluente.

5. Ensaio de determinação da sensibilidade de cepas de *C. pseudotuberculosis* frente aos extratos de própolis vermelha, verde e marrom obtidos por extração com CO₂ supercrítico e extração etanólica

Para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC), os extratos de própolis supercrítica e etanólica foram diluídos em Tween 80 a 20% com concentração máxima de Tween de 1% após as diluições seriadas.

Foram testadas as concentrações no intervalo de 0,016 a 8 mg/mL. Também foi realizado o controle do diluente.

6. Análises estatísticas

As médias obtidas para os diâmetros de inibição de crescimento bacteriano no teste de susceptibilidade de antibióticos e de susceptibilidade às diferentes diluições de própolis vermelha, marrom e verde foram expressas como médias \pm desvios padrão.

Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal, os resultados de densidade óptica obtidos para os extratos de própolis estudados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os mesmos não apresentavam distribuição normal, foi então aplicado o teste de Wilcoxon signed-rank, onde os resultados obtidos de cada extrato, frente as cepas de *C. pseudotuberculosis*, foram comparados entre si. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados do teste de sensibilidade pelo método de disco difusão (**Tabela 5**) indicaram uma elevada sensibilidade das cepas de *C. pseudotuberculosis* aos agentes antimicrobianos, e as cepas de *C. pseudotuberculosis* VD57 e N1 demonstraram resistência apenas para a oxacilina.

Tabela 5 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de diferentes cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pelo método de difusão em disco. A classificação da cepa como resistente, intermediária ou sensível foi feita de acordo com o proposto pelo CLSI, 2012.

Antimicrobiano	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>		
	1002	VD57	N1
Sulfazotrin	S	S	S
Amicacina	S	S	S
Ampicilia	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S
Doxiciclina	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S
Clindamicina	S	S	S
Penicilina	S	S	S
Amoxicilina	S	S	S
Eritromicina	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S
Enrofloxacina	S	S	S
Oxacilina	I	R	R
Tetraciclina	S	S	S
Bacitracina	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S
Gentamicina	S	S	S
Cefalotina	S	S	S

S: sensível; I : Intermediário; R: resistente

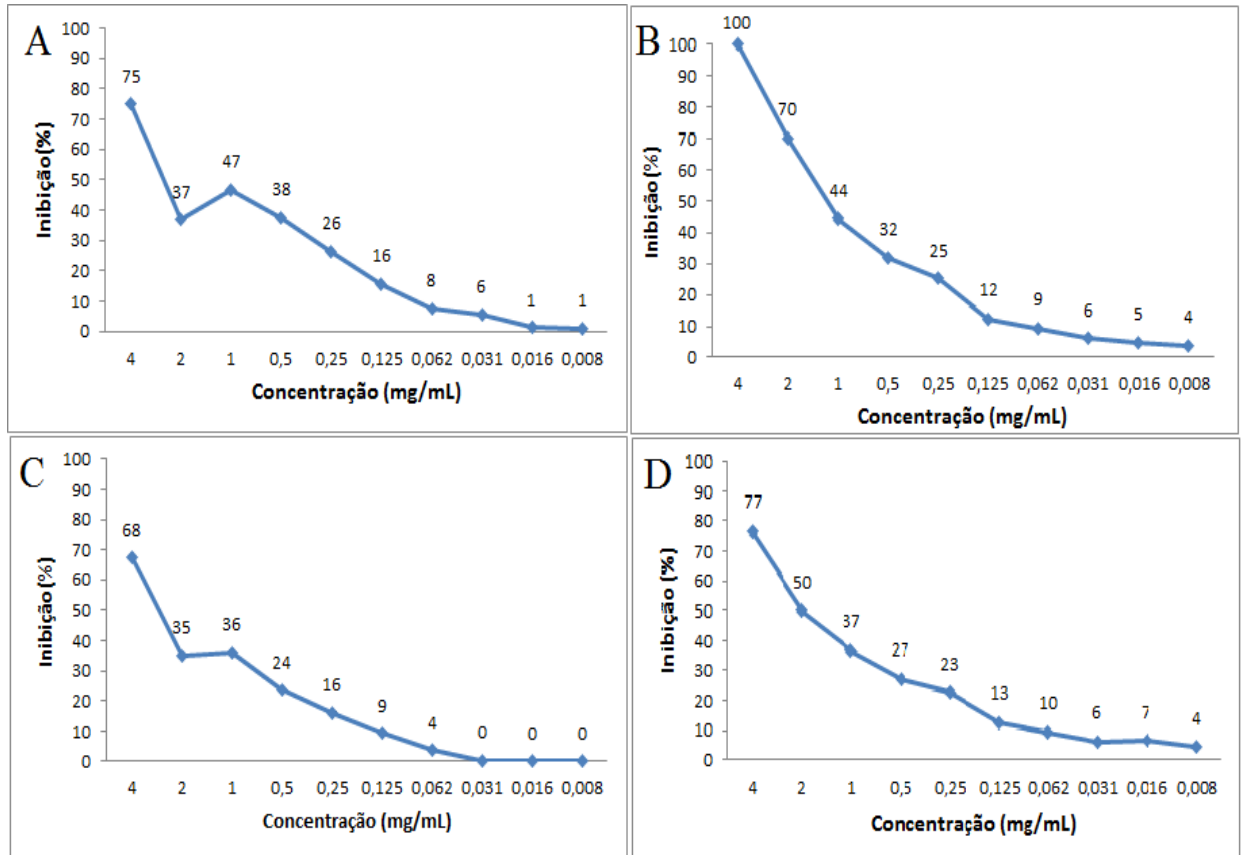
Quando utilizada a metodologia de microdiluição em caldo com antibióticos comerciais, os menores valores MIC foram para penicilina, cefalotina, ceftriaxona e clindamina. *C. pseudotuberculosis* foi menos sensível para o antibiótico doxiciclina, com intervalos de MIC entre 0.39 µg/mL e 12.5 µg/mL (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Resumo das MICs e MBCs de seis agentes antimicrobianos para os isolados de *C. pseudotuberculosis* pelo método de microdiluição em caldo. Os números representam a média de dois experimentos independentes.

Antimicrobiano	Intervalo (µg)	1002		VD57		N1	
		MIC (µg)	MBC (µg)	MIC (µg)	MBC (µg)	MIC (µg)	MBC (µg)
Amoxicilina	0.048 - 25	≥ 1.56	≥ 1.56	≥ 3.13	≥ 6.25	≥ 1.56	≥ 1.56
Cefalotina	0.234 - 120	≥ 0.94	≥ 0.94	≥ 0.94	≥ 0.94	≥ 0.94	≥ 0.94
Ceftriaxona	0.390 - 200	≤ 0.39	≤ 0.39	≥ 0.78	≥ 1.56	≥ 0.78	≥ 0.78
Clindamicina	0.048 - 25	≥ 0.09	≥ 0.09	≥ 0.39	≥ 0.39	≥ 0.39	≥ 0.78
Doxiciclina	0.097-50	≥6.25	≥6.25	≥0.39	≥0.39	≥12.5	≥12.5
Penicilina	< 0.001 – 0.134	≤ 0.001	≤ 0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	> 0.0005

Um ensaio preliminar foi realizado, utilizando a cepa 1002, para definir qual condição do processo de extração supercrítica da própolis vermelha demonstraria a melhor atividade antimicrobiana sobre o *C. pseudotuberculosis*, e os resultados estão expressos na **Figura 3**. Todas as condições testadas para a extração supercrítica de própolis vermelha apresentaram atividade antimicrobiana, porém a própolis extraída a temperatura de 40°C e pressão de 300 bar apresentou o melhor resultado da ação antimicrobiana, chegando a 100% de inibição na concentração de 4 mg/mL.

Figura 3. Avaliação da atividade antimicrobiana de própolis vermelha brasileira em diferentes condições de pressão e temperatura durante extração supercrítica, sobre a cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis*. As condições foram (A) 50°C e 400 bar; (B) 40°C e 300 bar; (C) 40°C e 400 bar; (D) 50°C e 200 bar. Os resultados expressam a média de dois experimentos independentes.



Como base nos resultados obtidos no ensaio preliminar, a concentração de 8 mg/ml foi definida como a concentração máxima para testes de inibição do crescimento das cepas de *C. pseudotuberculosis*, pois é uma concentração acima da concentração de 4 mg/mL, onde começou-se a ter uma inibição de 100%. Os resultados de MICs e MBCs obtidos com os extratos supercríticos da própolis vermelha e extratos etanólicos da própolis vermelha, verde e marrom estão na **Tabela 7**.

C. pseudotuberculosis apresentou sensibilidade a todos os extratos de própolis testados. As cepas testadas frente ao extrato supercrítico de própolis vermelha apresentaram valores de MIC e MBC maiores ou iguais a 4mg/mL, exceto a cepa 1002 que apresentou um valor de MBC igual ou superior a 8mg/mL. O extrato etanólico de própolis verde apresentou o menor valor de MIC entre os extratos testados, de 2mg/mL frente a cepa 1002. A menor atividade antimicrobiana do extrato foi observada quando encontramos valores de MIC e MBC iguais ou superiores a 8mg/mL para a cepa VD57.

A menor atividade antimicrobiana encontrada pertence ao extrato etanólico de própolis marrom, que apresentou valores de MIC e MBC superiores às concentrações testadas no experimento. Porém, esse extrato inibiu completamente o crescimento bacteriano da cepa VD57 em concentrações de MIC e MBC iguais a 8mg/mL

Tabela 7 –MICs e MBCs de extrato supercrítico de própolis vermelha e extratos etanólicos de própolis vermelha, verde e marrom frente aos isolados de *C. pseudotuberculosis* pelo método de microdiluição em caldo. Os números representam a média de dois experimentos independentes.

Amostras	Intervalo (mg)	1002		VD57		N1	
		MIC (mg)	MBC (mg)	MIC (mg)	MBC (mg)	MIC (mg)	MBC (mg)
RAL SCO ₂ 4	0.016 – 8	≥ 4	≥ 8	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
RAL EtOH	0.016 – 8	≥ 4	≥ 8	> 8	> 8	≥ 4	≥ 4
GPR EtOH	0.016 – 8	≥ 2	≥ 4	≥ 8	≥ 8	≥ 4	≥ 4
BSC EtOH	0.016 – 8	> 8	> 8	≥ 8	≥ 8	> 8	> 8

Os resultados de MIC e MBC da ação antimicrobiana dos extratos etanólico e supercríticos de própolis do presente estudo, nos intervalos de concentrações testadas (0.016 – 8mg/mL), são melhores visto nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

Figura 4 - Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato supercrítico de própolis vermelha sobre *C. pseudotuberculosis*. As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1 (C). Os resultados expressam médias de dois experimentos diferentes.

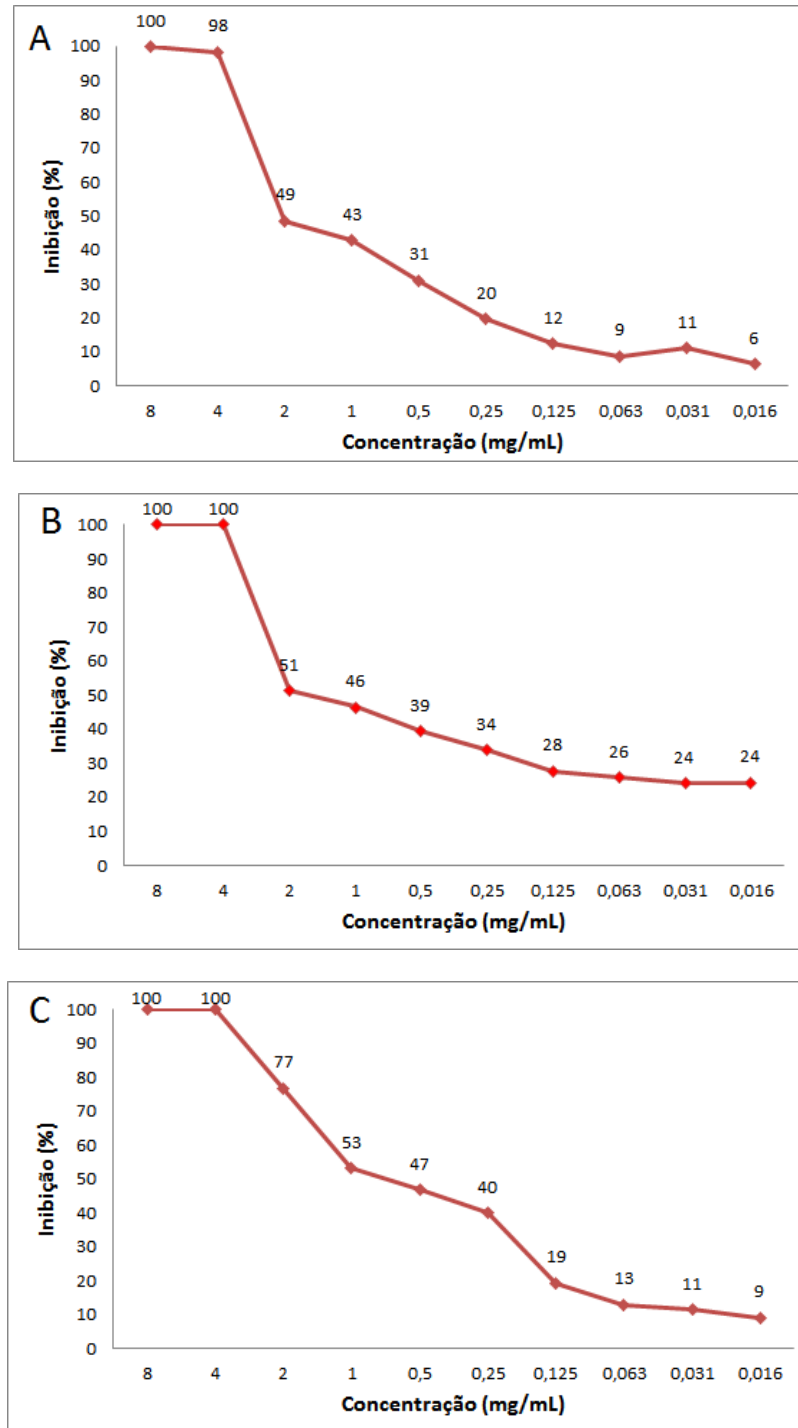


Figura 5. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de própolis vermelha sobre *C. pseudotuberculosis*. As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1 (C). Os resultados expressam médias de dois experimentos diferentes.

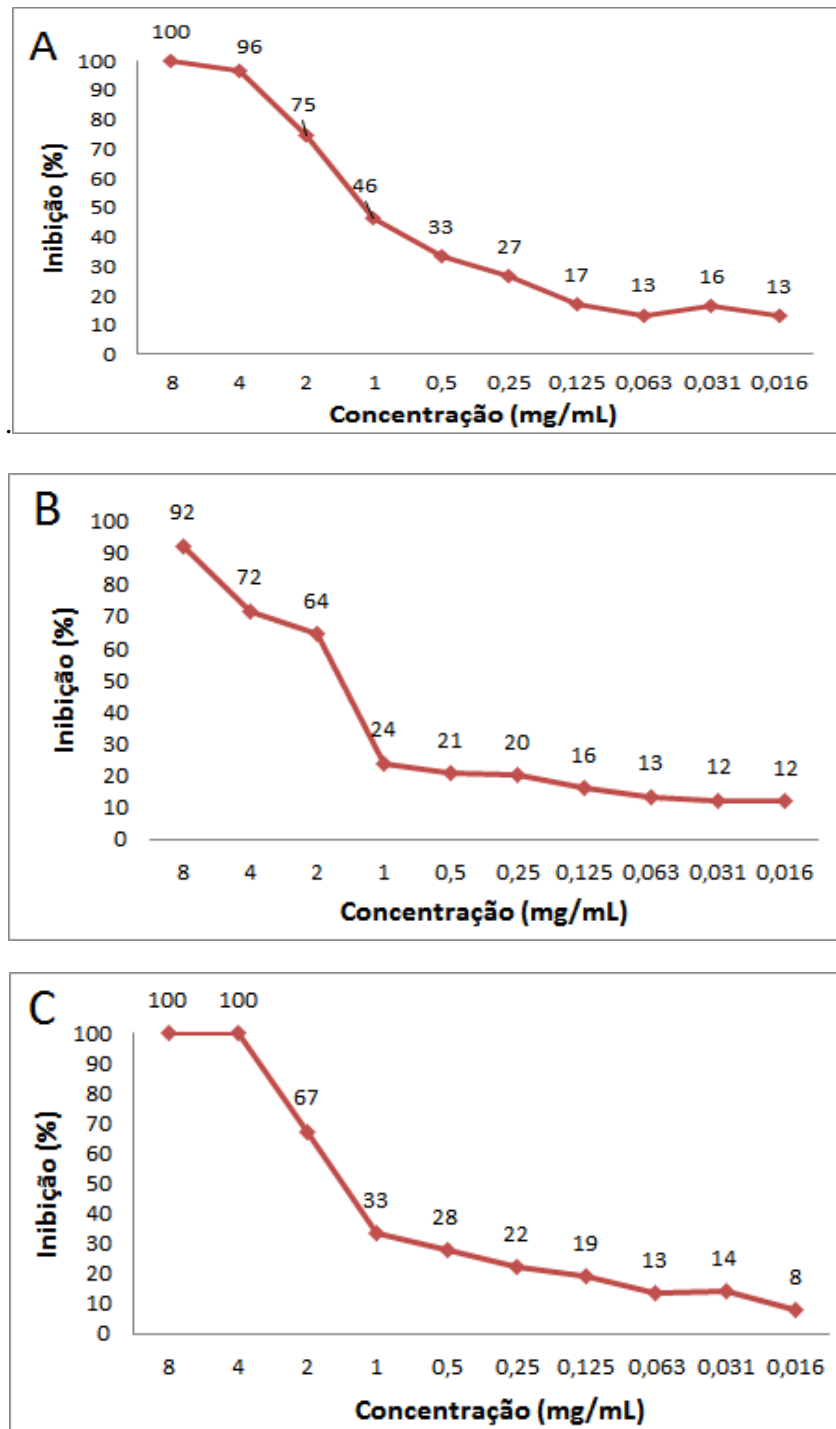


Figura 6. - Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de própolis verde sobre *C. pseudotuberculosis*. As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1 (C). Os resultados expressam a média de dois experimentos diferentes.

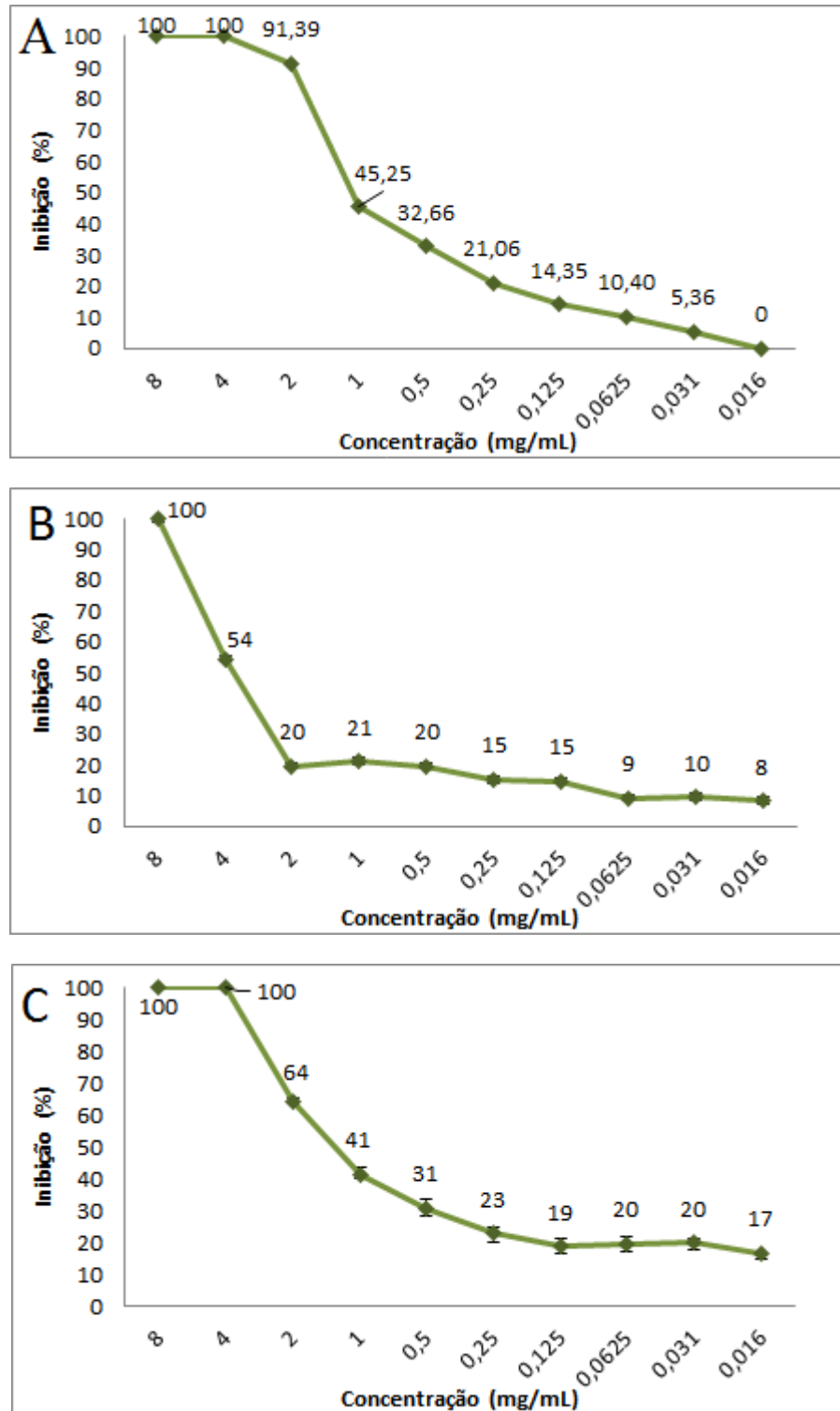
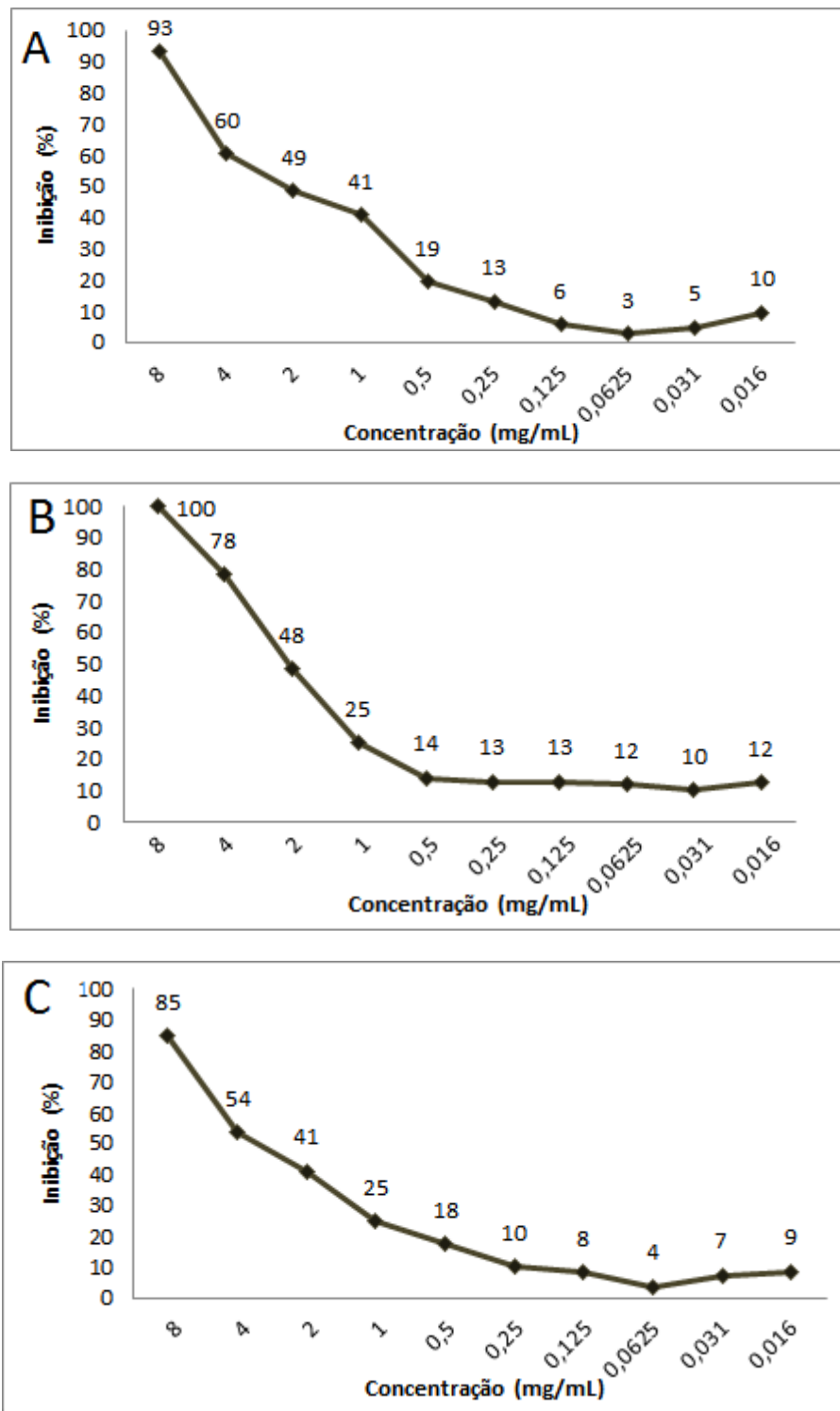
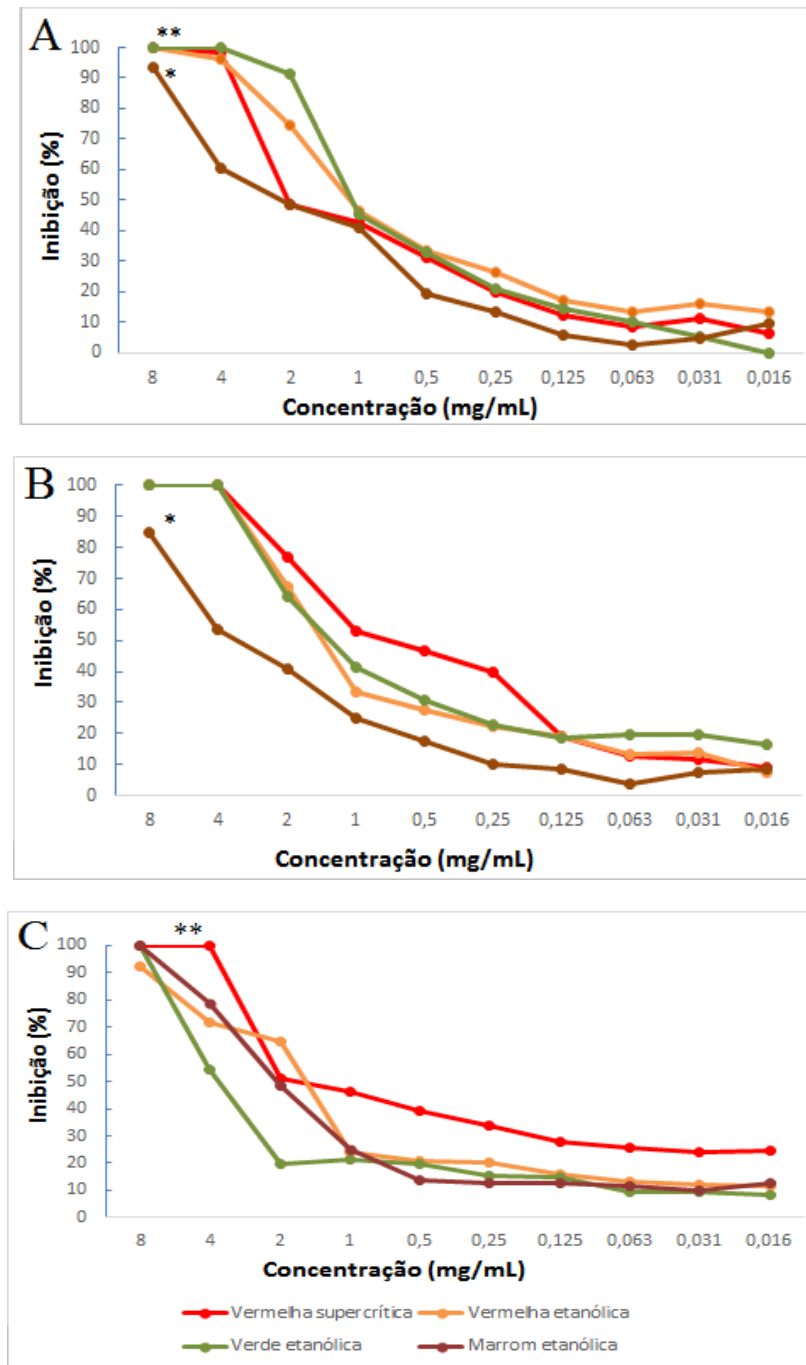


Figura 7. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de própolis marrom sobre *C. pseudotuberculosis*. As cepas utilizadas foram 1002 (A), VD57 (B) e N1 (C). Os resultados expressam a média de dois experimentos diferentes.



Os resultados estatísticos identificaram diferenças significativas entre os extratos de própolis, frente às cepas de *C. pseudotuberculosis*, quando foram comparados entre si. O extrato etanólico de própolis verde apresentou melhor atividade antimicrobiana frente à cepa 1002 (**Figura 8A**), enquanto que o extrato supercrítico de própolis vermelha foi o mais efetivo contra a cepa VD57 (**Figura 8C**). Também foi identificada diferença estatística significativa quando encontramos menor atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis marrom e da própolis vermelha entre todos os extratos de própolis testados contra a cepa N1 (**Figura 8B**).

Figura 8. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e supercrítico de própolis vermelha, verde e marrom sobre *C. pseudotuberculosis*, cepa 1002 (A), N1 (B) e VD57 (C). Os resultados são expressos como médias de dois experimentos diferentes cada. *Diferença estatística significativa com $p < 0,05$ no de Wilcoxon signed-rank quando comparados o extrato de própolis marrom e todos os extratos testados, e ** Diferença estatística significativa com $p < 0,05$ entre os extratos de própolis vermelha supercrítica e verde etanólica.



DISCUSSÃO

Na metodologia do teste de sensibilidade antimicrobiana, o ágar Mueller-Hinton é considerado o melhor teste de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas por apresentar reprodutibilidade aceitável, produção de crescimento satisfatório da maioria dos patógenos e pela existência de um grande acervo de dados e experiências relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio (CLSI, 2005). Bactérias como *C. pseudotuberculosis* exigem meios enriquecidos como ágar sangue ou ágar BHI para um crescimento satisfatório (MOURA-COSTA *et al.*, 2012). Diante disso, o meio BHI foi utilizado para a realização do teste de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo. O ágar sangue não foi utilizado no teste de difusão em disco porque o acréscimo de Tween 80 para o crescimento do *C. pseudotuberculosis* leva a um aumento da atividade hemolítica das cepas (SUTHERLAND; SPEIJERS, ANDRES, 1989), dificultando a leitura dos halos de inibição.

Os resultados do teste de difusão em disco com 20 antimicrobianos e o teste de microdiluição em caldo apenas confirmam a elevada sensibilidade *in vitro* de *C. pseudotuberculosis* aos antimicrobianos, a qual já foi relatada em outros países, como na Índia (MOHAN *et al.*, 2008) e na Etiópia (ABEBE *et al.*, 2015), em cepas sequenciadas e em isolados coletados em abatedouros de exportação, e em isolados de *C. pseudotuberculosis* produtores de biofilmes (SÁ *et al.*, 2013). Esse mesmo resultado foi descrito em isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* em equinos (NORMAN *et al.*, 2014; RHODES *et al.*, 2015) e suínos (OLIVEIRA *et al.*, 2014a).

Um dos principais fatores que podem justificar a elevada sensibilidade *in vitro* de *C. pseudotuberculosis* aos antimicrobianos estão relacionados ao tipo de criação de pequenos ruminantes e ao controle e tratamento de animais com LC. As propriedades rurais utilizaram sistemas de criação extensivas e/ou semi-extensivas, e nesses tipos de propriedades, a criação é dedicada à produção de carne ou leite e os animais são criados exclusivamente em pastagens durante o dia, com alguma proteção à noite. Além disso, o tratamento da LC é cirúrgico, com remoção, limpeza e desinfecção das lesões ou isolamento e descarte dos animais infectados, o que seria uma das estratégias de

controle da enfermidade (GUIMARÃES *et al.*, 2011; VOIGT *et al.*, 2012). Outro fator importante é que, a ausência da antibioticoterapia no tratamento da LC resulta em ausência de pressão seletiva de antibióticos e, conseqüentemente, a um menor desenvolvimento de resistência de *C. pseudotuberculosis*. Sabe-se que uma pressão seletiva contínua de antibióticos rotineiramente utilizados caracteriza uma condição prévia e importante para o desenvolvimento de cepas multirresistentes (TELLO *et al.*, 2012), o que muito provavelmente não está acontecendo na criação de pequenos ruminantes e nos patógenos que os acometem.

Ainda que os resultados *in vitro* mostrem uma excelente ação dos antimicrobianos, o tratamento da LC é refratário *in vivo*, provavelmente devido a espessa cápsula fibrosa em torno das lesões típicas e à natureza espessa e caseosa do conteúdo dentro da cápsula. A natureza intracelular do organismo durante as partes do ciclo da doença também pode conferir alguma proteção contra certos antibióticos comumente empregados no tratamento da doença (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007). Diante disso, a própolis surge como um tratamento eficaz contra a LC, uma vez que os seus extratos são ricos em compostos e os quais atuam em sinergismo com vários compostos químicos bioativos, que são responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora.

O ensaio preliminar foi fundamental para determinada qual condição de extração supercrítica da própolis vermelha demonstraria a melhor atividade antimicrobiana e, a partir deste resultado, utilizar a melhor condição para realização dos testes de susceptibilidade com todos os extratos de própolis. Sabendo que todas as condições testadas da extração supercrítica de própolis vermelha apresentaram alguma atividade antimicrobiana, podemos concluir que os parâmetros de pressão e temperatura têm efeitos significativos no processo de extração dos compostos biologicamente ativos presentes na própolis que possuem ação antibiótica.

Essas diferenças de ação antimicrobiana entre os extratos supercríticos podem estar relacionadas a outros fatores além da temperatura e pressão, como a concentração de co-solvente, as curvas globais de extração e a produção e extração global de isotérmicos. Isso é bem evidenciado no estudo realizado por Machado *et al.*, (2015), onde os extratos de própolis verde que tiveram um alto conteúdo de compostos

fenólicos, flavonoides, artepilina C e alta atividade antioxidante foram obtidos nas condições de 50°C, 350 bar, S/F 110 e na presença de 1% de etanol como co-solvente.

Em outro estudo de otimização do processo de extração de metabólitos e atividades biológicas da planta *Arthrospira platensis* realizado por (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017), a extração de maior rendimento tinha pressão de 450 bar, temperatura de 40°C e fluxo de CO₂, utilizando etanol como co-solvente. Entretanto, os extratos obtidos em pressão de 450 bar, temperatura de 60°C e fluxo de CO₂, e utilizando etanol como co-solvente, apresentaram maior conteúdo de metabólitos bioativos, como p-caroteno, luteína, tocoferóis e ácido γ -linoléico, melhor atividade antioxidantes e atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231.

Mesmo sendo estudos (MACHADO *et al.*, 2015; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017) com extratos diferentes, podemos notar que as condições de extração são bastante variáveis e que a obtenção dos compostos bioativos desses extratos podem estar relacionadas a sua natureza hidrofílica (BISCAIA *et al.*, 2009). É possível perceber também que essas condições podem influenciar diretamente na quantidade de metabólitos que possuem atividade antimicrobiana. No entanto, deve-se considerar que os parâmetros de temperatura e de pressão deste trabalho (40°C e 300bar), que demonstraram a melhor atividade antimicrobiana sobre *C. pseudotuberculosis* (**Figura 2B**), são mais próximos ao estudo realizado por Machado *et al.* (2015), e corrobora também com o que foi descrito por Grange & Davey (1990) e Lamb *et al* (2005), os quais sugeriram que a atividade antimicrobiana da própolis está associada ao alto conteúdo de flavonóides e Artepillin C, encontradas principalmente nos extratos de própolis vermelha originadas da Região Nordeste do Brasil (MACHADO *et al.*, 2016).

Quando comparamos ação antimicrobiana dos extratos supercríticos e etanólica da própolis (**Tabela 7 e Figuras 4 e 8**), vemos que o extrato supercrítico da própolis vermelha apresentou melhor atividade contra a cepa de *C. pseudotuberculosis*, VD57. A **Tabela 7** também mostra os menores valores de MIC e MBC do extrato supercrítico de própolis vermelha entre as cepas testadas. Esse resultado pode estar relacionado ao método de extração, onde vários estudos descrevem que os extratos de própolis obtidos por SFE, utilizando etanol como co-solvente, são ricos em diferentes compostos ativos

(polissacarídeos, flavonas e terpenos), sendo assim um método altamente eficiente e seletivo para o processo de extração dos mesmos (MACHADO *et al.*, 2013). Porém, Zordi *et al.* (2014) relatam que o extrato de n-hexano e SCO₂ de própolis possuem os mesmos constituintes e que essa semelhança de composição está relacionada a natureza lipofílica do solvente SCO₂ e a proporção entre os constituintes. Como consequência disto, a quantidade de constituintes fenólicos extraídos pelo método SCO₂ é menor do que no extrato de etanol. Essa diferença de compostos bioativos é evidenciada no estudo realizado por Machado *et al.* (2016a), que observaram que a maior atividade antimicrobiana *in vitro* para *Staphylococcus aureus* (ATCC 33951 e 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi do extrato etanólico de própolis vermelha, que também apresentou o maior teor de compostos fenólicos e altos valores de flavonoides.

Logo, pode se verificar que a menor quantidade de compostos fenólicos e flavonoides (**Tabela 3**) não interferiram na atividade antimicrobiana do SCO₂ de própolis vermelha sobre a cepa VD57, provavelmente devido a ação de compostos isolados que apresentaram maior atividade antibiótica. Os isoflavonóides neovestitol e vestitol, isolados da própolis vermelha brasileira, são exemplos de compostos bioativos que conseguem exercer atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* e *Actinomyces naeslundii*. O neovestitol mostrou MIC variando de < 6,25 a 25-50 µg/mL e MBC variando de 25-50 a 50-100 µg/mL, enquanto que o vestitol apresentou MIC variando de 25-50 a 50-100 µg/mL e MBC variando de 25-50 a 50-100 µg/mL (BUENO-SILVA *et al.*, 2013). Monos e sesquiterpenos de ácidos benzóicos provenientes de própolis iraniana também demonstraram atividade contra *S. aureus* (TRUSHEVA *et al.*, 2010). Ainda assim, é importante destacar que atividade antimicrobiana da própolis vermelha se deve ao efeito sinérgico de várias substâncias (CABRAL *et al.*, 2009)

O extrato de própolis verde também exibiu uma melhor atividade antimicrobiana contra a cepa de *C. pseudotuberculosis* 1002 com valores de MIC igual a 2 mg/mL e MBC igual a 4mg/mL (**Tabela 6 e Figuras 6 e 8**). O resultado difere dos experimentos realizado por Machado *et al.* (2016a) e Dantas Silva *et al.* (2017), nos quais o extrato etanólico de própolis vermelha mostrou maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

O melhor resultado desse tipo de extrato deve-se a grande quantidade de compostos isolados que possuem uma melhor atividade antioxidante, maior conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido p-cumárico e Artepillin C (MACHADO *et al.*, 2016a) que, atuando em sinergismo com outros componentes do extrato, é efetivo inibindo crescimento bacteriano de *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (VEIGA *et al.*, 2017).

Além dos compostos acima citados, outros princípios bioativos da própolis verde são também encontrados na sua principal fonte botânica, *B. dracunculifolia* DC, como os flavonoides ácido 2-hidroxi-ursólico e isosakuranetina, que mostraram atividade antibacteriana contra o *S.aureus* resistente à meticilina, com valores de IC₅₀ de 5 µg/mL e 3 µg/mL, respectivamente, e o flavonóide aromadendrina que demonstrou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (FILHO *et al.*, 2008). Portanto, a ação antibiótica de flavonoides encontrados na fonte botânica da própolis verde e que podem estar presentes no extrato de própolis, podem ter favorecido a uma melhor atividade antimicrobiana entre os extratos testados contra *C. pseudotuberculosis* cepa 1002.

A menor atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis marrom (**Tabela 7 e Figuras 7 e 8**) está relacionada aos valores mais baixos de fenóis, flavonóides e atividade antioxidante, culminando num menor potencial biológico, ou seja, maiores valores de MIC deste tipo de própolis quando comparado às amostras de própolis verdes e / ou vermelhas (MACHADO *et al.*, 2016a). As investigações realizadas por Gomes *et al.* (2016) corroboram com os resultados obtidos nesse estudo. Os altos valores de MIC das bactérias Gram-positivas, do extrato alcoólico de própolis marrom, variou entre 2,25 a 18,5mg/mL. As bactérias do gênero *Staphylococcus*, apresentaram MIC de 9,3mg/mL, indicando maior resistência desse gênero ao extrato de própolis, muito provavelmente à maior habilidade em desenvolver resistência a compostos em geral, sendo utilizado como um microrganismo de referência em testes de resistência. Neste trabalho verificou-se que, o extrato alcoólico de própolis apresentou MIC variando de 4,5 a 18,9mg/mL para *Escherichia coli* e de 4,5 a 9,3mg/mL para *P. aeruginosa*. Em um outro estudo, avaliando o potencial antimicrobiano do óleo essencial de própolis marrom, Fernandes *et al.* (2015) encontraram valores de MIC maiores que 1mg/mL contra *Klebsiella pneumoniae*,

Enterococcus faecalis, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Dois dos seus principais constituintes, nerolidol e espatulenol, mostraram atividade antimicrobiana contra as cepas citadas com MIC igual ou maior que 200 µg/mL.

Quando se compara os resultados com estudos de países, nota-se que a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis é independente da região geográfica, dos métodos de extração, da variedade dos compostos isolados e da origem botânica. O extrato metanólico de própolis coletada por *Apis mellifera* da província de Nan, na Tailândia, mostrou atividade antimicrobiana, *S. aureus*, *E. coli* e *Paenibacillus larvae* (BOONSAI *et al.*, 2014). Na Polônia, dois extratos de própolis ricos em ésteres de glicerol de ácidos fenólicos, bem como altas quantidades de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e seus ésteres de benzilo, apresentaram atividade contra bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*) (POPOVA *et al.*, 2017). A atividade dos extratos de própolis sérvia, rica em compostos fenólicos como galangina, crisina e pinocembrina foram bastante eficazes contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. As maiores sensibilidades foram contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (RISTIVOJEVIĆ *et al.*, 2016).

É importante destacar que, no nesse estudo os resultados dos testes de susceptibilidade utilizando os extratos de própolis vermelha, verde e marrom para *C. pseudotuberculosis* (**Tabela 7**) foram maiores do que os teste de sensibilidade com extratos de própolis vermelha descrito por Lopez *et al.* (2015) contra *Enterococcus faecalis* (200 - 50 µg ml⁻¹), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (100 - 25 µg ml⁻¹), *Staphylococcus epidermidis* (200 - 25 µg ml⁻¹) e *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615 (500 µg ml⁻¹). Em outro estudo realizado por Machado *et al.* (2016b) o extrato etanólico de própolis verde do estado de São Paulo apresentou atividade contra *S. aureus* (MIC de 159 µg/mL e MBC de 315 µg/mL), *E. faecalis* (MIC de 310 µg/ml e MBC > 630 µg/mL) e isolados de MRSA (MIC de 630 µg/mL e MBC > 630 µg/mL). Uma das possíveis justificativas estão ligadas ao clima ou períodos de coleta da própolis. Sabe-se que a composição química e a atividade antimicrobiana da própolis variam quantitativamente ao longo do ano devido as mudanças nas concentrações de

compostos bioativos, como a isoliquiritigenina, (3S)-ovovestitol e (3S)-vestitol, que são responsáveis pela atividade antimicrobiana contra diferentes espécies de bactérias e fungos (BUENO-SILVA *et al.*, 2017). Além disso, fatores como a sazonalidade, que são bastante evidentes na Região Nordeste do Brasil, com duas estações bem distintas seca e chuvosa, influenciam na concentração e composição de metabólitos e consequentemente na atividade antibacteriana, que se traduz em maior ou menor MIC (NETO *et al.*, 2017). Porém, a principal explicação esteja relacionada a arquitetura de parede celular do *C. pseudotuberculosis*. A membrana plasmática do *C. pseudotuberculosis* é composta por uma camada de peptidoglicano, que está ligada covalentemente a um polímero de arabinogalactano, e uma camada externa de ácidos micólicos que é funcionalmente equivalente à membrana externa de bactérias Gram-negativas (BURKOVSKI *et al.*, 2013). É possível que essa seja uma explicação para que os extratos de própolis possam agir sobre essas bactérias, com 100% de eficácia, mas em maiores concentrações.

Os mecanismos de virulência podem ser responsáveis pelos maiores valores de MIC de *C. pseudotuberculosis* cepa VD57 frente aos extratos de própolis verde e vermelha, que tiveram melhores atividades antibacteriana. Provavelmente este resultado pode estar relacionado a sua alta virulência e patogenicidade para pequenos ruminantes e camundongos (MOURA-COSTA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2016). A literatura ainda não descreveu um estudo de correlação entre virulência e susceptibilidade de corinebactérias, entretanto, um experimento realizado por Scheller *et al.* (1999) correlacionando a virulência de 17 cepas de micobactérias e sua susceptibilidade ao extrato etanólico de própolis (EEP), não encontrou uma correlação total entre a virulência das micobactérias testadas e a susceptibilidade ao EEP. Porém, a adição de EEP a meio contendo drogas antituberculose aumentou a sensibilidade de micobactérias, mesmo que uma resistência inicial a alguns dos antibióticos tenha sido registrada durante as primeiras semanas de exposição (SCHELLER *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou elevada sensibilidade das cepas de *C. pseudotuberculosis* aos agentes antimicrobianos comerciais pelo teste de difusão em disco, exceto para o antimicrobiano oxacilina. *C. pseudotuberculosis* mostrou ser sensível aos seis agentes antimicrobianos testados pelo método de microdiluição em caldo.

O extrato etanólico de própolis verde apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra *C. pseudotuberculosis*, cepa 1002.

O extrato supercrítico de própolis vermelha, em condições de extração na temperatura de 40°C e pressão de 300bar, apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra *C. pseudotuberculosis*, cepa VD57.

Uma menor atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis marrom quando comparado às amostras de extrato de própolis verde e vermelhas.

As diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* apresentaram sensibilidade aos diferentes extratos de própolis. Porém, a cepa VD57 apresentou os maiores valores de MICs frente aos extratos de própolis testados. Provavelmente este resultado pode estar relacionado a sua alta virulência e patogenicidade.

REFERÊNCIAS

ABEBE, D.; SISAY TESSEMA, T. Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 469–476, 2015.

ALMEIDA, S.; TIWARI, S.; MARIANO, D.; SOUZA, F.; JAMAL, S. B.; COIMBRA, N.; RAITTZ, R. T.; DORELLA, F. A.; CARVALHO, A. F. de; PEREIRA, F. L.; SOARES, S. de C.; LEAL, C. A. G.; BARH, D.; GHOSH, P.; FIGUEIREDO, H.; MOURA-COSTA, L. F.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

AL-RAWASHDEH, O. F.; AL-QUDAH, K. M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in awassi sheep in Jordan. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 4, p. 287–293, 2000.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: O Estado da Arte. **EMBRAPA Documentos**, v. 74, 1^a edição, p. 57, 2007

ANDRADE, J. S. L.; AZEVEDO, E. O.; AZEVEDO, S. S.; TELES, J. A. A.; HIGINO, S. S. S. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116–120, 2012.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J. R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled

sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1-2, p. 67–81, 2003

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007.

BANSKOTA, K. A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; S. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16–22, 2001.

BARAÚNA, R. A.; RAMOS, R. T. J.; VERAS, A. A. O.; PINHEIRO, K. C.; BENEVIDES, L. J.; VIANA, M. V. C.; GUIMARÃES, L. C.; EDMAN, J. M.; SPIER, S. J.; AZEVEDO, V.; SILVA, A. Assessing the genotypic differences between strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi through comparative genomics. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2017.

BASTOS, B. L.; MEYER, R.; GUIMARÃES, J. E.; AYRES, M. C.; GUEDES, M. T.; MOURA-COSTA, L. F.; DE BURGHGRAVE, U. S.; SENA, L.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 496–503, 2011.

BASTOS, B. L.; PORTELA, R.W.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N.; PAULA, T. L. De.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal Clinical & Cellular Immunology**, v. 84, p. 15, 2012.

BEN SAID, M.S.; BEN MAITIGUE, H.; BENZARTI, M.; MESSADI, L.; REJEB, A. A. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. **Archives Institute Pasteur Tunis**. 79, 51–7, 2002.

BINNS SH.; BAILEY M.; GREEN LE. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **Veterinary Record**, v.150, p. 263–8, 2002.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 17–23, 2009.

BOONSAI, P.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; CHANCHAO, C. Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 327–336, 2014.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1351–1358, 2012.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4: 256- 265, 2013.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–30, 2015.

BRUM, A. A.; REZENDE, A. de F. S.; BRILHANTE, F. S.; COLLARES, T.; BEGNINE, K.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. V.; DELLAGOSTIN, O. A.; AZEVEDO, V.; SANTOS, A.; PORTELA, R. W.; BORSUK, S. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 635–642, 2017.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; SILVA, G. V. J. D.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, 2013.

BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

BURKOVSKI, A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. **ISRN Microbiology**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

CABRAL, F. A.; PAVIANI, L. C.; SAITO, E.; DARIVA, C.; MARCUCCI, M. C.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 243–251, 2012.

CAMPOS, Â. P.; MIRANDA, D. F. H.; RODRIGUES, H. W. S.; DA SILVA CARNEIRO LUSTOSA, M.; MARTINS, G. H. C.; MINEIRO, A. L. B. B.; CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; DE SOUSA SILVA, S. M. M. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 5, p. 899–907, 2017.

CARMO, F.; GUIMARÃES, A.; PAULETTI, R.; LAGE, A.; GONÇALVES, V.; MEYER, R.; PORTELA, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.; HEINEMANN, M. Prevalência de anticorpos contra a linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 79, n. 2, p. 293–296, 2012.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 75–83, 2002.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 549–556, 2008.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 1–2, p. 170–175, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Supplemental tables. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement**. CLSI Publication M100-S15, M2-A8 and M7-A6. Pennsylvania: CLSI; 2005

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement**. CLSI Publication M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007.

COLOM-CADENA, A.; VELARDE, R.; SALINAS, J.; BORGE, C.; GARCA-BOCANEGRA, I.; SERRANO, E.; GASS, D.; BACH, E.; CASAS-DAZ, E.; LPEZ-OLVERA, J. R.; SANTIAGO, L.; LEN-VIZCANO, L.; MENTABERRE, G. Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 83, 2014.

CONNOR, K. M.; QUIRIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2633–2637, 2000.

DAFFÉ, M. The cell envelope of corynebacteria. In: Eggeling L, Bott M, editors. **Handbook of *Corynebacterium glutamicum***. Boca Raton, p. 121–148, 2005.

DA SILVA, J. F. M.; DE SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; DE ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 431–435, 2006.

DANTAS SILVA, R. P.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F.; BARBOSA, D. V.; UMSZA-GUEZ, M. A. cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, p. 1–18, 2017.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. Van; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167–175, 2000.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; COSTA, O. S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, p. 201–216, 2006.

DORELLA, F. a; PACHECO, L. G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205–213, 2009.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; HANSON, K. M.; WILSON, W. D.; GARDNER, I. a. Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, n. 4, p. 229–39, 1998.

EGGLETON, D. G.; HAYNES, J. A.; MIDDLETON, H. D.; COX, J. C. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 10, p. 322–325, 1991.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, n. 3-4, p. 303–316, 1991.

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D. A.; CUÉLLAR, S. P.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.; GARCÍA-PÉREZ, S. J.; ANDRADE, E.; NUÑEZ- ECHEVARRÍA, JADE VALENCIA, A.; ROSTRO-ALANIS, M.; TORRES, J. A.; CHEN, W. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Effect of Supercritical Carbon Dioxide Extraction Parameters on the Biological Activities and Metabolites Present in Extracts from *Arthrospira platensis*. **Marine Drugs**, v. 15, p. 174, 2017.

FERNANDES, F. H.; GUTERRES, R.; VIOLANTE, I. M. P.; LOPES, T. F. S.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1482–1488, 2015.

FERNÁNDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A. R.; DE OCA PORTO, R. M.; HERNÁNDEZ, I. M.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927–9932, 2008.

FERRER, L. M.; LACASTA, D.; CHACÓN, G.; RAMOS, J. J.; VILLA, A.; GÓMEZ, P.; LATRE, M. V. Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in a Salzwedder ewe. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1–3, p. 126–127, 2009.

FILHO, A. A. S.; SOUSA, J. P.; SOARES, S.; FURTADO, N.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; GREGÓRIO, L. E.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift Fur Naturforschung**, C, v. 63, n. 1, p. 40–46, 2008.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986–5996, 2006.

GARDJEVA, P.A.; DIMITROVA, S.Z.; KOSTADINOV, I.D.; MURDJEVA, M.A.; PEYCHE, L.P.; LUKANOV, L.K.; STANIMIROVA, I.V.; ALEXANDROV, A.S. A study of chemical composition and antimicrobial activity of Bulgarian propolis. **Folia Medica**, v. 49, p. 63-69, 2007.

GAO, W.; WU, J.; WEI, J.; PU, L.; GUO, C.; YANG, J.; YANG, M.; LUO, H. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. **Journal Clinical Biochemistry Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 7–10, 2014.

GOMES, M. F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279–282, 2016.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n. 3, p. 159–60, 1990.

GOMES, M. F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V.; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279–282, 2016.

GUIMARÃES, A. M. G.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; GUIMARÃES, A. de S.; DO CARMO, F. B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **Veterinary Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 11, 2011.

HASEGAWA, M. Y.; MEIRA, E. B. S.; LARA, M. C. C. S. H.; CASTRO, R. S.; RODRIGUES, J. N. M.; ARAÚJO, J.; KELLER, L. W.; BRANDÃO, P. E.; RIZZO, H.; BARBOSA, M. L.; GAETA, N. C.; ROSSI, R. S.; DURIGON, E. L.; GREGORY, L. Small ruminant lentivirus variants and related clinical features in goats from southeastern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 140, p. 32–36, 2016.

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÁVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGEN, L.; SUNDSET, A.; SORUM, H.; FROLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2015.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 954–957, 1999.

HUANG, S.; ZHANG, C.-P.; WANG, K.; LI, G.; HU, F.-L. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, v. 43, p. 1–49, 2015.

IZUTA, H.; SHIMAZAWA, M.; TSURUMA, K.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; HARA, H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 45, 2009.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 1, p. 69–73, 2003.

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K.; KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 156, 2015.

KUMAR, N.; AHMED, K. M.; RAMAN, D.; AHMED, H. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. **Journal of Medical Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 361–364, 2008.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K.; WAHOME, R. G. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. **Veterinary Research Communications**, v. 25, n. 2, p. 89–97, 2001.

LAMB, A. J.; CUSHNIE, T. P. T. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.

LATIF, N. A. A.; ABDULLAH, F. F. J.; OTHMAN, A. M.; RINA, A.; CHUNG, E. L. T.; ZAMRI-SAAD, M.; SAHAREE, A. A.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M. Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non-pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 924–927, 2015.

LOPEZ, B. G. C.; DE LOURENÇO, C. C.; ALVES, D. A.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M.; SAWAYA, A. C. H. F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: An alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

LOUREIRO, D.; PORTELA, R. W.; SOUSA, T. J.; ROCHA, F.; PEREIRA, F. L.; DORELLA, F. A.; CARVALHO, A. F.; MENEZES, N.; MACEDO, E. S.; MOURA-COSTA, L. F.; MEYER, R.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C.; AZEVEDO, V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* viscerotropic strain N1. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. e01673–15, 2016.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2209–2213, 2010.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇÃO, A.; DA SILVA, M.; REIS, A.; COSTA, G.; ARRUDA, D. de S.; ROCHA, B.; VAZ, M. M. M. O. L. L.; PAES, A. M.; GUERRA, R. N.; BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, F. R. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 10, 2012.

MACHADO, B.A.S.; PEREIRA, C.G.; NUNES, S.B.; PADILHA, F.F.; UMSZAGUEZ, M.A. Supercritical fluid extraction using CO₂: main applications and future perspectives. **Separation Science and Technology**, v.48, n.18, p. 2741–2760, 2013.

MACHADO, B. A. S.; DE ABREU BARRETO, G.; COSTA, A. S.; COSTA, S. S.; SILVA, R. P. D.; DA SILVA, D. F.; BRANDAO, H. N.; DA ROCHA, J. L. C.; NUNES, S. B.; UMSZAGUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–26, 2015.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. D. A.; COSTA, S. S.; DA SILVA, D. F.; BRANDO, H. N.; DA ROCHA, J. L. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016a.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O. De; DE OLIVEIRA, F. D. C. E.; CARDOSO, M. V.; FERREIRA, R. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; FERREIRA, A. G.; PESSOA, C.; CUESTA-RUBIO, O.; MONTEIRO, M. C.; DE CAMPOS, M. S.; TORRES, Y. R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. type 12, 2016b.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; DANTAS, A. P. Phenolic compound from brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 74, 105-112, 2001.

MATSUNO, T. A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 50, n. 1-2, p. 93–97, 1995.

MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physicochemical methods. **Biology Pharmacology Bull**, Tokyo, v.20, n.5, p.496-501, 1997.

MENDONÇA, L. S. De; MANUELLA, F.; MENDONÇA, R. De; LIZIANE, Y.; MAIA, F.; ARAÚJO, E. D. De; RAMALHO, S. A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; ORELLANA, S. C.; PADILHA, F. F.; CARDOSO, J. C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe , Brazil. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 291–298, 2015.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1–2, p. 129–137, 2004.

MOHAN, P.; VATHSALA, M.; JAYAPRAKASAN, V. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1–3, p. 226–230, 2008.

MOREIRA, L., DIAS, L.G., PEREIRA, J.A., ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology** 46, 3482–3485, 2008.

MOURA-COSTA, L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the etiological agent of the caseous lymphadenitis in goats. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105–115, 2002.

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1–2, p. 131–141, 2008.

MOUSSA, I. M.; ALI, M. S.; HESSAIN, A. M.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; SELIM, S. A. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 718–723, 2016.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NETO, M. S. R.; TINTINO, S. R.; DA SILVA, A. R. P.; COSTA, M. do S.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F. F.; DE QUEIROZ BALBINO, V.; MENEZES, I. R. A.; MELO COUTINHO, H. D. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1–9, 2017.

NORMAN, T. E.; BATISTA., M.; LAWHON, S. D.; ZHANG, S.; KUSKIE, K. R.; SWINFORD, A. K.; BERNSTEIN, L. R.; COHEN, N. D. In vitro susceptibility of equine-obtained isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to gallium maltolate and 20 other antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2684–2685, 2014.

OLIVEIRA, M.; BARROCO, C.; MOTTOLA, C.; SANTOS, R.; LEMSADDEK, A.; TAVARES, L.; SEMEDO-LEMSADDEK, T. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 218, 2014a.

OLIVEIRA, P. F. De; SOUZA, I. M. De; MUNARI, C. C.; BASTOS, J. K.; ALVES, A.; TAVARES, D. C. Comparative evaluation of anti-proliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. **Planta Medica**, v. 80, p. 490–492, 2014b.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86–92, 2002.

O'REILLY, K. M.; GREEN, L. E.; MALONE, F. E.; MEDLEY, G. F. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, n. 3–4, p. 242–259, 2008.

O'REILLY, K. M.; MEDLEY, G. F.; GREEN, L. E. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 1–2, p. 115–126, 2010.

OREIBY, A.; HEGAZY, Y.; OSMAN, S.; GHANEM, Y.; AL-GAABARY, M. Caseous lymphadenitis in small ruminants in Egypt. Clinical, epidemiological and prophylactic aspects. **Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere**, v. 42, n. 5, p. 7–8, 2014.

OTHMAN, A. M.; ABBA, Y.; JESSE, F. F. A.; ILYASU, Y. M.; SAHAREE, A. A.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M. Reproductive Pathological Changes Associated with Experimental Subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Nonpregnant Boer Does. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p. 7, 2016.

PAULINO, N.; RAGO, S.; ABREU, L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound , Artepilina C , in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296–301, 2008.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; DE ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100–1103, 2004.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C.; RASTRELLI, L.; PONTE, V.; MELILLO, D.; FARMACIA, I. De; HABANA, U. D. La; HABANA, L. Cuban and Brazilian Red Propolis : Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography À Photodiode Array Detection / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PIMENTA, H. C.; VIOLANTE, I. M. P.; MUSIS, C. R. De; BORGES, Á. H.; ARANHA, A. M. F. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2015.

POPOLO, A.; PICCINELLI, L. A.; MORELLO, S.; CUESTA-RUBIO, O.; SORRENTINO, R.; RASTRELLI, L.; PINTO, A. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1711–1716, 2009.

POPOVA, M.; GRAIKOU, K.; WIDELSKI, J.; BANKOVA, V.; KALOFONOS, H.; ANTOSIEWICZ, B.; CHINOU, I. Propolis from Poland. **Molecules**, v. 22, p. 1159, 2017.

PRESCOTT, J. F.; SUNIL, V.; MENZIES, P. I.; SHEWEN, P. E. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 3–4, p. 288–297, 2008.

PUECH, V.; CHAMI, M.; LEMASSU, A.; SCHIFFLER, B.; GOUNON, P.; LANE, M.; BAYAN, N.; BENZ, R.; DAFFE, M. Structure of the cell envelope of corynebacteria : importance of the non- covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**, n. 2001, p. 1365–1382, 2017.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 103–110, 2006.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; F, A. R. M.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; HANNA, S. A. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1296–1302, 2013.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

RHODES, D. M.; MAGDESIAN, K. G.; BYRNE, B. A.; KASS, P. H.; EDMAN, J. Minimum Inhibitory Concentrations of Equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates (1996 – 2012). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 327–332, 2015.

RIBEIRO, M. G.; BELOTTA, A. F.; FERNANDES, M. C.; GUENA, R.; DE JÚNIOR, G. N.; LARA, G. H. B.; GIUFFRIDA, R.; DE ZAMPROGNA, T. O. Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 839–843, 2011.

RIBEIRO, D.; DORELLA, F. A.; CASTRO, T.L.P.; PACHECO, L. G. C. Subclinical Diagnosis of Caseous Lymphadenitis Based on ELISA in Sheep from Brazil. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 3, 2013.

RISTIVOJEVIC, P.; DIMKIC, I.; TRIFKOVIC, J.; BERIC, T.; VOVK, I.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; STANKOVIC, S. Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

SÁ, M. da C. A.; VESCHI, J. L. A.; SANTOS, G. B.; AMANSO, E. S.; OLIVEIRA, S. A. S.; MOTA, R. A.; VENERONI-GOUVEIA, G.; COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319–1324, 2013.

SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; SANTOS, V. W. S. dos; RODRIGUES, A. de S.; LIMA, A. M. C.; OLIVEIRA, E. L. de; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. de. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 273–280, 2013.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1–7, 2002.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243–249, 2000.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C.; SILVA, E.; CARVALHO, C. A.; EBERLIN, M. N. Original article Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees . **Apidologie**, v. 38, p. 93–103, 2007.

SHELLER, S.; KAWASAKI, H.; OKLEK, K.; DWORNICZAK, S.; MATSUNO, T.; WALDEMAR-KLIMMEK, K.; RAJCA, M.; SHANI, J. Correlation between Virulence of Various Strains of Mycobacteria and Their Susceptibility to Ethanolic Extract of Propolis (EEP) . **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 53, n. 11–12, p. 1040–1044, 1998.

SHELLER, S.; DWORNICZAK, S.; WALDEMAR-KLIMMEK, K.; RAJCA, M.; TOMCZYK, A.; SHANI, J. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. **Journal of Biosciences**, v. 54, n. 7–8, p. 549–553, 1999.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. A. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. April 2008, p. S20–S28, 2010.

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; LIBERA, A. M. M. P. Della; BENESI, F. J.; AZEDO, M. R.; DE S??, L. R. M.; RIBEIRO, M. S.; DA SILVA BAPTISTA, M.; POGLIANI, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis

abscesses in sheep: Report of ten cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 120–122, 2016.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 50–55, 2010.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis , a New Type of Brazilian Propolis. **Advance Access Publication**, v. 5, n. July 2007, p. 313–316, 2008.

SOARES, S. C.; SILVA, A.; TROST, E.; BLOM, J.; RAMOS, R.; CARNEIRO, A.; ALI, A.; SANTOS, A. R.; PINTO, A. C.; DINIZ, C.; BARBOSA, E. G. V; DORELLA, F. A.; ABURJAILE, F.; ROCHA, F. S.; NASCIMENTO, K. K. F.; GUIMAR??ES, L. C.; ALMEIDA, S.; HASSAN, S. S.; BAKHTIAR, S. M.; PEREIRA, U. P.; ABREU, V. A. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; MIYOSHI, A.; TAUCH, A.; AZEVEDO, V. The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar ovis and equi Strains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013a.

SOARES, S. C.; TROST, E.; RAMOS, R. T. J.; CARNEIRO, A. R.; SANTOS, A. R.; PINTO, A. C.; BARBOSA, E.; ABURJAILE, F.; ALI, A.; DINIZ, C. A. A.; HASSAN, S. S.; FIAUX, K.; GUIMARÃES, L. C.; BAKHTIAR, S. M.; PEREIRA, U.; ALMEIDA, S. S.; ABREU, V. A. C.; ROCHA, F. S.; DORELLA, F. A.; MIYOSHI, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V.; TAUCH, A. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 135–141, 2013b.

SUTHERLAND, S. S.; SPEIJERS, E. J.; ANDRES, B. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Research in Veterinary Science**, n. 47, p. 190-194, 1989.

TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis : **Bee Behavior , Plant Anatomy and Chemistry**. v. 2, n. January, p. 85–92, 2005.

TELLO, A.; AUSTIN, B.; TELFER, T. C. Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1100–1106, 2012.

TRIPATHI, B. N.; KUMAR, J.; SONAWANE, G. G.; KUMAR, R.; DIXIT, S. K. Microbiological and Molecular Investigation of Clinically Suspected Caseous Lymphadenitis Cases in Goats. **Agricultural Research**, v. 5, n. 4, p. 413–419, 2016.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J. G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7–8, p. 683–689, 2004.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; CRISTINA, M.; MIORIN, P. L.; PASIN, R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Advance Access Publication**, v. 3, n. May, p. 249–254, 2006.

TRUSHEVA, B.; TODOROV, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H.; DANESHMAND, A.; BANKOVA, V. Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 4, p. 8, 2010.

URAL, K.; ALIC, D.; HAYDARDEDEOGLU, A. E.; CEDDEN, F.; GUZEL, M.; ÖZYILDIZ, Z.; CANTEKIN, Z. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Saanen ?? Kilis crossbred (White) goats in Ankara, Turkey and effective kanamycin

treatment: A prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 1, p. 84–88, 2008.

VALENTE, M.J., BALTAZAR, A.F., HENRIQUE, R., ESTEVINHO, L.M., CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology** 49, 86–92, 2011.

VEIGA, R. S.; MENDONÇA, S. De. Artepilina C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 911–920, 2017.

VELAZQUEZ, C.; NAVARRO, M.; ACOSTA, A.; ANGULO, A.; DOMINGUEZ, Z.; ROBLES, R.; ROBLES-ZEPEDA, R.; LUGO, E.; GOYCOOLEA, F. M.; VELAZQUEZ, E. F.; ASTIAZARAN, H.; HERNANDEZ, J. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1747–1756, 2007.

VOIGT, K.; BAIRD, G. J.; MUNRO, F.; MURRAY, F.; BRULISAUER, F. Eradication of caseous lymphadenitis under extensive management conditions on a Scottish hill farm. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 1, p. 21–24, 2012.

WAGH, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. II, 2013.

WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L. da G.; CHAVES, F.; ZANI, J. L.; DE FARIA, R. O.; DE MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117–121, 2017.

WASHBURN, K. E.; BISSETT, W. T.; FAJT, V. R.; LIBAL, M. C.; FOSGATE, G. T.; MIGA, J. A.; ROCKEY, K. M. Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 9, p. 1162–1166, 2009.

WASHBURN, K. E.; FAJT, V. R.; LAWHON, S. D.; ADAMS, L. G.; TELL, L. A.; BISSETT, W. T. Caprine abscess model of tulathromycin concentrations in interstitial fluid from tissue chambers inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* following subcutaneous or intrachamber administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6295–6304, 2013.

WILLIAMSON LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. 17: 359-371, 2001.

WINDSOR, P. A. Control of caseous lymphadenitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, v. 1, p. 193-202, 2011.

WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? **Small Ruminant Research**, v. 142, p. 6–10, 2016.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. **Veterinary Quarterly**, v. 18, p. 87–89, 1996.

ZORDI, N.; CORTESI, A.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; SOLINAS, D.; INNOCENTI, G.; PORTOLAN, A.; BARATTO, G.; DALL'ACQUA, S. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 491–498, 2014.